ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

ANNÉE 1972 Nº 2

ENQUETE EPIDEMIOLOGIQUE SUR LA TOXOPLASMOSE CANINE DANS L'ALGEROIS EXPERIMENTATION D'ANTIGENES OBTENUS SUR CULTURES CELLULAIRES

THESE

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Diplôme d'Etat

Présentée et soutenue publiquement en Juin 1972

DEVANT

L'UNIVERSITÉ PAUL-SABATIER DE TOULOUSE

PAR

SENNELIER (Jacques, Henri, Pierre)

Né le 7 mars 1946 à Charenton le Pont (Seine)

Jury:

Président:	M. ARMENGAUD	Professeur à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse
Assesseurs	M. FLORIO	Professeur à l'Ecole Nat. Vétérinaire de Toulouse
	M. BRIZARD	Professeur à l'Ecole Nat. Vétérinaire de Toulouse

IMPRIMERIE MÉCANOGRAPHIQUE ISSY-COPIE
9 bis, rue Madeleine Moreau
92 - ISSY LES MOULINEAUX

ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE
ANNÉE 1972 Nº 2

ENQUETE EPIDEMIOLOGIQUE SUR LA TOXOPLASMOSE CANINE DANS L'ALGEROIS EXPERIMENTATION D'ANTIGENES OBTENUS SUR CULTURES CELLULAIRES

THESE

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Diplôme d'Etat

Présentée et soutenue publiquement en Juin 1972

DEVANT

L'UNIVERSITÉ PAUL-SABATIER DE TOULOUSE

PAR

SENNELIER (Jacques, Henri, Pierre)

Né le 7 mars 1946 à Charenton le Pont (Seine)

Jury:

Président:	M. ARMENGAUD	Professeur à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse
Assesseurs	M. FLORIO	Professeur à l'Ecole Nat. Vétérinaire de Toulouse
	M. BRIZARD	Professeur à l'Ecole Nat. Vétérinaire de Toulouse

IMPRIMERIE MÉCANOGRAPHIQUE ISSY-COPIE
9 bis, rue Madeleine Moreau
92 - ISSY LES MOULINEAUX

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur : M. FLORIO Professeur Honoraire : M. LOMBARD

Directeurs Honoraires : MM. PONS
DARRASPEN

- PERSONNEL ENSEIGNANT -

CHAIRE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE

Professeur titulaire — M. GODFRAIN
Maître-Assistant — Mme BURGAT-SACAZE
Pharmacie et Toxicologie

CHAIRE DE PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES

Professeur titulaire — M. RICO
Physique biologique et médicale
Chimie biologique et médicale

CHAIRE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES

Professeur titulaire — M. PAVAUX
Anatomie descriptive - Extérieur
Anatomie appliquée - Tératologie

CHAIRE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE

Professeur titulaire — M. RUCKEBUSCH
Maître-Assistant Agrégé — M. FARGEAS
Physiologie - Thérapeutique et Pharmacodynamie

CHAIRE D'HISTOLOGIE - ANATOMIE PATHOLOGIQUE

Professeur titulaire — M. VAN HAVERBEKE
Professeur sans Chaire — M. CABANIE
Maître-Assistant — M. MAGNOL
Histologie - Embryologie
Anatomie Pathologique

CHAIRE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE

Professeur titulaire — M. LABIE
Maître-Assistant — M. EECKHOUTTE
Hygiène, Inspection, Contrôle et Technologie des denrées alimentaires d'origine animale

CHAIRE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES

Professeur titulaire — M. BRIZARD
Maître-Assistant Agrégé — M. DORCHIES
Zoologie appliquée - Parasitologie externe - Parasitologie interne - Clinique

CHAIRE DE SEMIOLOGIE ET PATHOLOGIE MEDICALE DES EQUIDES ET CARNIVORES

Professeur titulaire — M. FLORIO
Maître de Conférences, non chef de service, Prof. sans Chaire — M. LESCURE
Maître-Assistant — M. GUELFI
Sémiologie et Pathologie médicale des Equidés et Carnivores - Législation Vétérinaire et déontologie - Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR

Professeur titulaire — M. TOURNUT
Professeur sans Chaire — M. ESPINASSE

Maître-Assistant — M. BEZILLE
Sémiologie et Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour - Clinique - Clinique ambulatoire

CHAIRE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE

Professeur titulaire — M. CAZIEUX
Propédeutique et Sémiologie chirurgicale - Technique chirurgicale - Pathologie chirurgicale

CHAIRE DE PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION

Professeur titulaire	M. BERTHELON
Professeur sans Chaire	M. ROYAL

Sémiologie et propédeutique
Pathologie de la reproduction
Obstétrique - Clinique

CHAIRE DE MALADIES CONTAGIEUSES - ZOONOSES - LEGISLATION SANITAIRE

Professeur titulaire	M. SAURAT
Maître-Assistant Agrégé	M. CHANTAL

Maladies contagieuses - Zoonoses - Législation sanitaire

CHAIRE DE PATHOLOGIE GENERALE - MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE

Professeur titulaire	M. LAUTIE
Maître-Assistant	M. MEIGNIER

Microbiologie - Immunologie - Pathologie générale

CHAIRE DE ZOOTECHNIE ET ECONOMIE RURALE

Professeur titulaire	M. QUEINNEC
Maître-Assistant	M. DARRE

Ethnologie - Génétique appliquée - Hygiène générale
Zootechnie - Elevage - Economie générale et des productions animales

CHAIRE D'ALIMENTATION

Professeur titulaire	M. FALIU
Maître-Assistant Agrégé	M. GRIESS

Botanique appliquée et Bromatologie - Agronomie - Alimentation

- COURS COMPLEMENTAIRES - CHARGES D'ENSEIGNEMENT -

Antibiothérapie des Maladies Infectieuses	M. MONNIER
Aspect médical des Zoonoses	M. ARMENGAUD
Energétique	M. LABOUCHE
Initiation à l'Informatique Biomédicale	M. FERNET
Agronomie	M. COMBRET
Métabolismes	M. RAYNAUD

La Faculté et l'Ecole déclarent n'être pas responsables des opinions émises par les candidats
(délibération de la Faculté en date du 10 mai 1891, et du Conseil de l'Ecole, en date du 13 juin 1924).

A tous ceux qui me sont chers

A notre Président de thèse,

M. le Professeur ARMENGAUD

de l'Université Paul-Sabatier

qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

A notre jury de thèse :

M. le Professeur FLORIO

Directeur de l'Ecole Vétérinaire de Toulouse
Chevalier de la Légion d'Honneur
Officier de l'Ordre National du Mérite

nous lui sommes très reconnaissant d'avoir bien voulu juger notre travail.

M. le Professeur BRIZARD

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Chevalier de la Légion d'Honneur

qui a accepté de siéger à notre jury de thèse.

A M. le Professeur LESCURE

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

qui nous a encouragé à entreprendre cette étude.

A M. GUELFI

Maître Assistant à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

qui nous a toujours réservé un accueil chaleureux.

Ce travail a été réalisé dans le cadre de

L'INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE

Nous tenons à remercier

- le Docteur R. NEEL

  Sous-Directeur de l'Institut Pasteur de Paris
  Ancien Directeur de l'Institut Pasteur d'Algérie

dont l'aide très précieuse et les encouragements bienveillants nous ont permis de mener à bien ce travail,

- M. J. GYSIN, Docteur es Sciences,

qui, tout au long de la réalisation de ce travail, n'a pas cessé de nous conseiller avec une extrême gentillesse,

- le Docteur R. SCHNEIDER

  Chef de Service à l'Institut Pasteur d'Algérie

pour tous les conseils qu'il a bien voulu nous donner,

INTRODUCTION

Depuis la découverte en Tunisie par NICOLLE et MANCEAUX en 1908 de l'agent de la toxoplasmose : Toxoplasma gondii, cette maladie commune à l'homme et à l'animal n'a guère retenu l'attention des microbiologistes travaillant en Algérie.

Une seule enquête épidémiologique a été réalisée en 1955 par L. BALOZET.

Depuis cette époque, la connaissance de la toxoplasmose a beaucoup progressé ; en particulier, de nouvelles réactions sérologiques ont été mises au point.

Nous avons voulu expérimenter certaines de ces techniques au cours de l'enquête que nous avons effectuée à l'Institut Pasteur d'Algérie sur 105 chiens de la fourrière municipale de la ville d'Alger.

Nous avons travaillé avec des méthodes immunologiques récentes : immunofluorescence indirecte, électrosynérèse - mais nous avons repris la réaction de fixation du complément déjà utilisée par L. BALOZET.

Nous nous sommes tournés vers la technique des cultures cellulaires pour préparer les antigènes nécessaires à notre enquête.

Nous rapportons, dans la première partie de ce travail, les résultats de nos recherches bibliographiques concernant le toxoplasme, la toxoplasmose canine et les méthodes sérologiques de diagnostic.

Dans la seconde partie, nous présentons nos travaux personnels sur la préparation, le fractionnement et l'utilisation d'antigènes préparés sur cultures cellulaires.

RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE PREMIER

TOXOPLASME ET TOXOPLASMOSE

La toxoplasmose est une maladie infectieuse due à Toxoplasma gondii, isolé en 1908 par NICOLLE et MANCEAUX chez un rongeur d'Afrique du Nord : Ctenodactylus gondii (66) et en 1909 par SPLENDORE chez le lapin.

1) LE TOXOPLASME

Le toxoplasme est un protozoaire piriforme arrondi ; c'est un parasite mobile obligatoirement intracellulaire.

Des travaux récents en microscopie électronique ont montré que le toxoplasme se multiplie par endodyogénie, c'est-à-dire par un phénomène de division interne au sein de la cellule mère, très différent de la division binaire (75).

MORPHOLOGIE

Le parasite apparaît sous deux formes : une forme végétative au stade aigu de l'infection et sous une forme enkystée, lorsque la maladie est chronique.

La morphologie de la forme végétative dépend du type de préparation examinée.

Examiné au microscope entre lame et lamelle, dans le liquide d'ascite d'une souris infectée par voie intra-péritonéale, le toxoplasme se présente sous la forme d'un croissant mesurant 4 à 7 µ de long sur 2 à 4 µ de large, dont l'une des extrémités est pointue et l'autre arrondie avec un gros noyau.

Fixé et coloré au May-Grünwald-Giemsa, le toxoplasme apparaît de taille plus petite, très arqué. Le noyau coloré en rouge se distingue facilement du cytoplasme bleu pâle. Lors d'infection chronique, on peut rencontrer des amas de parasites au niveau du cerveau, des yeux, des muscles, entourés d'une paroi fine et élastique. Ces amas constituent des kystes mesurant de 50 à 150 µ.

Le microscope électronique révèle l'existence d'une paroi constituée de deux membranes. La membrane interne se termine à chaque pôle par un épaississement formant un anneau polaire. Sous la paroi, des fibrilles au nombre de 22 prennent naissance à l'anneau polaire antérieur pour se terminer à l'anneau polaire postérieur. A la partie antérieure du toxo-

plasme au niveau du noyau, on trouve une invagination de la membrane externe qui constitue le micropyle.

L'extrémité antérieure contient un organite cylindrique ou tronc conique situé à l'intérieur de l'anneau polaire, le conoïde. En relation avec cette formation, on distingue des organites en forme de massue, toujours en nombre pair. Des micronèmes ayant la forme de baguettes incurvées s'observent dans la partie antérieure. L'ultra structure comprend également un appareil de Golgi, des mitochondries, des ribosomes, un réticulum endoplasmique et des vacuoles (82).

BIOLOGIE

Le toxoplasme se rencontre chez de nombreux mammifères, y compris l'homme et d'autres primates, les bovins, les moutons, les porcs, les marsupiaux, les tatous, les hérissons, les chiens, les chats, les renards, divers mustélidés et de nombreux rongeurs.

Le toxoplasme ne possède apparemment pas de spécificité d'hôte, bien que des passages multiples soient parfois nécessaires pour adapter les souches d'un animal à l'autre.

C'est un parasite intracellulaire des cellules nuclées. On peut le trouver dans toutes les cellules nuclées, mais il a une prédilection pour celles des systèmes réticuloendothélial, musculaire, ainsi que celles du système nerveux central et de ses annexes, notamment la rétine.

SOURANDER (87) a montré que le parasite envahit activement les cellules, où il se multiplie en provoquant une augmentation de volume de la cellule d'hôte. Celle-ci éclate et libère des toxoplasmes qui sont capables d'infecter de nouvelles cellules.

La présence du parasite dans un organisme vivant entraîne une réponse immunitaire qui se manifeste en général par l'apparition d'anticorps circulants.

Le parasite se conserve 8 jours à + 4°C et 209 jours dans les glycérols à 5% à - 80°C avec une congélation lente et une décongélation rapide (27).

Les formes végétatives sont sensibles aux agents chimiques et physiques. Elles sont tuées par l'ébullition, par le chauffage à 55°C pendant 5 minutes ; le phénol à 5% ou l'alcool à 70% pendant 10 minutes (83). Les kystes résistent plus longtemps que les formes végétatives.

Au laboratoire, on conserve le plus souvent les souches de toxoplasmes par des passages constants sur la souris. On peut cultiver le parasite sur oeufs de poule embryonnés ou sur cultures de tissus. C'est du reste cette dernière technique que nous avons adoptée pour préparer les antigènes nécessaires

à l'enquête sérologique, dont nous présentons plus loin les résultats.

CLASSIFICATION

La systématique de Toxoplasma gondii est bien difficile à préciser. Dans le dernier rapport de l'O.M.S. consacré à la toxoplasmose et paru en 1969 (68), celui-ci est rangé dans la famille des Toxoplasmidés à côté des Besnoitiidés et des Sarcocystidés.

Ces trois familles voisines sont groupées dans la classe des Toxoplasmidés, que l'on rattache aux Sporozoaires.

S'il s'agit bien de Sporozoaires, leur reproduction doit comporter un stade sexué. On connait bien chez le toxoplasme une forme végétative et une forme enkystée, mais pour le moment le stade sexué n'a pas été mis en évidence. On suppose qu'il pourrait se situer au moment du passage du kyste à un nouvel hôte.

Tant que l'on n'aura pas complètement élucidé le cycle évolutif des différents parasites appartenant à la classe des Toxoplasmides, il sera impossible de les ranger dans une classification systématique satisfaisante.

2) LA TOXOPLASMOSE CANINE

C'est en 1910 que UGO MELLO (62) décrivit le premier cas mortel de toxoplasmose chez le chien. Par la suite, plusieurs cas furent décrits dans d'autres parties du monde.

L'introduction des méthodes sérologiques dans le diagnostic de la toxoplasmose humaine et leur usage chez le chien ont permis de découvrir que cette infection était plus répandue qu'on ne le pensait.

La toxoplasmose, acquise ou congénitale (50), est très souvent asymptomatique. On peut distinguer une forme latente, inapparente et une forme spontanée, difficile à identifier sans le secours du laboratoire, en raison de la diversité des symptômes sous lesquels elle peut se manifester.

- la forme latente

C'est SIIM (83) qui a individualisé cette forme. Il s'appuie sur les enquêtes sérologiques au cours desquelles on a pu isoler des souches de toxoplasmes chez des chiens en bonne santé, porteurs d'anticorps antitoxoplasmiques.

- la forme spontanée

Le tableau clinique qui accompagne la forme spontanée n'étant pas caractéristique, il ne faut pas s'étonner de la diversité des observations rapportées par les cliniciens.

FRANKHAUSER (33) décrit chez le chien 2 formes de toxoplasmose :

a) une forme viscérale caractérisée par de la fièvre, un mauvais état général de la gastroentérite avec diarrhée. Cette forme est mortelle en 2 à 10 semaines

b) une forme nerveuse qui se manifeste par des troubles psychiques et locomoteurs.

CAMPBELL (14) souligne que la forme viscérale et la forme nerveuse peuvent parfois être associées.

GROULADE (43) classe les symptômes sous 2 formes :

a) une forme à évolution rapide, qui dure 1 à 4 semaines et qui s'accompagne :

1 - de localisations nerveuses, se traduisant par un changement de caractère, des fugues, des parésies, des paralysies brutales transitoires ou définitives ;

2 - de localisations viscérales avec inappétence, vomissements, diarrhées, toux, troubles cardiaques, pulmonaires, ascite ;

3 - de localisations diverses généralement rares, articulaires, musculaires et cutanées. Cette forme est mortelle chez le jeune de 3 à 6 mois.

b) une forme à évolution lente, qui peut durer plusieurs mois et parfois même plusieurs années. Elle s'accompagne de poussées aiguës avec des localisations très diverses :

1 - localisations nerveuses, se traduisant par des troubles psychiques, agressivité, désir de fugue, troubles locomoteurs, névrite unilatérale et postérieure ;

2 - localisation oculaire, conjonctivite, ulcération de la cornée, exophtalmie, mydriase constante, cataracte atteignant des sujets jeunes ;

3 - localisations viscérales, dues à des perturbations de la fonction hépatorénale et s'accompagnant de vomissements, de diarrhées, de troubles cardiaques, d'ascite, de splénomégalie avec forte adénopathie (42) ;

4 - localisation sur appareil génital : ulcères de la verge et de l'utérus, métrites, pyomètres, avortements, mortinatalité

Les lésions observées vont de la nécrose grave aux proliférations granulomateuses de mononucléaires et de lymphocytes. Tous les organes peuvent être le siège de telles lésions.

La forme latente est caractérisée par la présence de kystes, sans répercussions sur l'état de santé de l'hôte, qui peuvent persister pendant toute la vie de l'animal.

Il est intéressant de noter que Toxoplasma gondii se comporte sur le plan clinique et anatomopathologique de manière uniforme chez toutes les espèces qui l'hébergent.

3) L'EPIDEMIOLOGIE DE LA TOXOPLASMOSE

Si on sait que les infections à Toxoplasma gondii atteignent l'homme et de nombreux vertébrés à sang chaud dans le monde entier, on connaît encore très mal les sources de l'infection et le mode de contamination.

On a trouvé le parasite dans l'urine de chien, de lapin, d'enfants atteints de toxoplasmose congénitale ; dans l'appareil respiratoire de l'homme, du pigeon, du chien ; dans l'estomac et l'intestin du chien ; dans la chair et le cerveau de porcs, de lapins, de moutons ; dans le colostrum ou le lait de truies, de vaches ; dans les ovaires de poules infectées ; également dans les sécrétions nasales et les fèces (83) (93).

Le mode de contamination n'est pas connu. On sait cependant que expérimentalement des animaux peuvent être infectés par voie veineuse, péritonéale, sous cutanée, intradermique, orale et intratrachéale, (85) (92) (47). A l'exception de l'infection congénitale, la transmission directe d'homme à homme ou d'animal à animal n'a pas été démontrée.

Il est possible que la transmission du parasite s'effectue par l'intermédiaire d'aliments contaminés par Toxoplasma gondii.

Des travaux récents ont montré le rôle joué par les helminthes (68) dans la dissémination du parasite. En particulier, il a été démontré que le toxoplasme peut être transmis expérimentalement par l'intermédiaire des oeufs de Toxocara cati, Métastrongylus apri et d'Hymenolepis nana.

On s'est penché sur les arthropodes, mais seules les études portant sur les tiques ont donné des résultats positifs (16).

CHAPITRE II

LE DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DE LA TOXOPLASMOSE

En dépit de la découverte de Toxoplasma gondii dès 1908, la toxoplasmose est restée pendant très longtemps une infection méconnue, en l'absence de réactions sérologiques précises, sensibles et fidèles.

C'est seulement à partir de la mise au point par SABIN et FELDMAN en 1948 (77) de l'épreuve de coloration que l'étude de la toxoplasmose a pu progresser.

Aujourd'hui, plusieurs méthodes sont à la disposition des biologistes pour le sérodiagnostic de la toxoplasmose.

1) LES METHODES SEROLOGIQUES DE DIAGNOSTIC

a) Test de neutralisation

Ce test proposé par.SABIN et RUCHMAN (78) est aujourd'hui abandonné ;

Il consiste à rechercher dans un sérum les anticorps neutralisants capables d'inhiber ou de modifier les lésions cutanées produites normalement sur la peau d'un lapin par une suspension de toxoplasmes vivants.

Ce test, qui fut d'abord largement employé, se heurte à des difficultés qui en limitent considérablement l'utilisation (29).

En effet, l'anticorps neutralisant est extrêmement labile ; il disparaît à température ordinaire et n'est présent qu'à forte concentration.

L'interprétation est toujours difficile car les lésions cutanées sont très variables selon l'exsudat employé ou la sensibilité propre du lapin.

Enfin ce test n'a qu'une valeur indicative car il ne fait pas de différence entre des individus sains porteurs d'anticorps et ceux atteints de toxoplasmose cutanée.

b) L'épreuve de coloration ou test de lyse du toxoplasme

Cette épreuve mise au point par SABIN et FELDMAN, appelée aussi réaction de Sabin-Feldman ou dye-test (77) (30) (68), donne d'excellents résultats. Elle est très sensible et

très spécifique des anticorps anti-toxoplasmiques. Son principe est le suivant : les toxoplasmes extra-cellulaires sont tués et perdent le pouvoir de se colorer par le bleu de méthylène alcalin, après avoir été incubés avec un sérum contenant des anticorps antitoxoplasmiques.

Cette perte de l'affinité tinctoriale est due à une lyse partielle ; la cellule parasitaire perd sa basophilie, à la suite de la disparition d'une partie de son cytoplasme. Il y a un gonflement de la membrane parasitaire suivi d'un éclatement du micro-organisme qui se vide de son contenu. (71)

L'anticorps spécifique est une sensibilisatrice thermostable. Inactive par elle-même, elle agit grâce à un activateur thermo-labile du sérum frais : le facteur accessoire, qui peut être en partie identifié avec le complément hémolytique.

Le facteur accessoire, qui ne se trouve que dans les sérums des sujets n'ayant jamais été en contact avec des toxoplasmes, se conserve à - 20°C, 2 à 3 mois et un an ou davantage à - 70°C ou à l'état lyophilisé.

On utilise des souris de 3 semaines que l'on inocule par voie intrapéritonale avec 20.000 à 200.000 toxoplasmes provenant de préférence de la souche RH. L'exsudat péritonéal est recueilli 48 à 72 heures plus tard au moment où il est fluide et riche en parasites. On emploie une concentration parasitaire standardisée. En général, les sérums d'animaux sont inactivés 20 minutes à 56°C, puis dilués. Après addition du mélange, facteur accessoire - toxoplasmes, les tubes sont incubés 1 heure à + 37°C. Une solution de bleu de méthylène à pH 11 préparée à partir d'une solution mère alcoolique saturée, est ajoutée à chaque tube et une goutte de chaque dilution est examinée entre lame et lamelle. Le titre de sérum est donné par la dilution finale pour laquelle 50% des parasites ne se colorent pas.

Des modifications à cette technique ont été apportées par LELONG et DESMONTS (54) en remplaçant le microscope ordinaire par le microscope à contraste de phase, qui permet d'apprécier directement les altérations cytoplasmiques du parasite provoquées par l'action d'un immum-sérum sans avoir recours à la coloration par le bleu de méthylène. Les parasites intacts apparaissent clairs et réfringents ; ceux qui sont altérés deviennent sombres et granuleux.

Lors de toxoplasmose expérimentale du chien (92), l'épreuve de coloration devient positive 1 à 2 semaines après l'inoculation. Le titre maximum étant atteint un mois plus tard, elle reste positive pendant plusieurs années.

c) Fixation du complément

Cette méthode spécifique et relativement sensible est assez ancienne. Elle a fait l'objet de nombreuses études depuis les premiers travaux de NICOLAU et RAVELO en 1937 (65).

Plusieurs procédés ont été mis au point pour préparer l'antigène nécessaire. En 1941, WARREN et SABIN (96) proposent un antigène à partir du cerveau de lapin et affirment que l'exsudat péritonéal obtenu à partir de souris est inutilisable car anticomplémentaire et non spécifique.

En 1948, WARREN et RUSS (95) ont utilisé un antigène à partir de toxoplasmes cultivés sur membrane chorio-allantoïdienne d'embryon de poulet, récoltés 7 jours après inoculation. Après broyage dans un mortier des membranes, on prépare une suspension à 10 % en eau physiologique tamponnée, qui est congelée et décongelée 5 fois de suite. Une centrifugation à 15.000 tours pendant une heure à + 4°C améliore la spécificité de l'antigène.

Depuis, STEEN (89), WESTPHAL (99) (100) et YANOVSKY (102) ont préparé des antigènes à partir d'exsudat péritonéal de souris ou de cobaye. Ces auteurs utilisent le plus souvent, pour produire la rupture des toxoplasmes, la congélation et la décongélation, mais d'autres procédés tels que l'action des ultra-sons, de l'eau distillée, des pressions très élevées, ont donné de bons résultats.

Enfin depuis quelques années, la mise au point de nouvelles techniques, permettant le développement de Toxoplasma gondii sur cellules en culture, a incité certains auteurs à utiliser un antigène obtenu sur cultures cellulaires (94) (4) et (97).

La technique de fixation varie suivant les auteurs ; les uns préconisent une fixation rapide (1 heure à + 37°C), d'autres préfèrent une technique de type Kolmer (12 à 18 heures à + 4° C).

La réaction de fixation du complément devient positive plus tardivement que l'épreuve de coloration, atteignant un titre maximum de 1/100 à 1/200 deux mois après le début de l'infection ; le test devient négatif 2 à 3 ans après l'infection.

d) L'épreuve d'immunofluorescence

Cette technique utilise le fait que les anticorps peuvent se combiner chimiquement à des colorants fluorescents, sans perdre la propriété de pouvoir se fixer sur l'antigène correspondant.

L'anticorps marqué en se combinant avec l'antigène rend fluorescent le complexe antigène - anticorps, que l'on pourra facilement mettre en évidence à l'aide d'un microscope spécialement équipé pour l'observation en lumière ultra-violette. Cette réaction s'éxécute selon 2 modalités principales :

1 - l'immunofluorescence directe : l'immun-sérum, qui agit sur l'antigène, est combiné avec une substance fluorescente

2 - l'immunofluorescence indirecte : c'est une réaction de type Combs, pratiquée en 2 temps. Dans le premier temps, on met en contact l'antigène avec le sérum ; dans le second temps, on fait agir le sérum fluorescent anti-globuline de l'espèce dont on titre le sérum.

On peut également employer une technique anticomplément, dans laquelle le réactif fluorescent est un sérum marqué anticomplément de cobaye. Le sérum à tester est laissé en contact avec l'antigène, puis le sérum anticomplément va se fixer sur le complexe antigène - anticorps. (51)

On peut aussi utiliser l'inhibition de la fluorescence. Dans cette technique, l'anticorps non fluorescent, introduit dans le premier temps de la réaction, inhibe la fixation de l'anticorps fluorescent, introduit dans le deuxième temps.

La première technique d'immunofluorescence appliquée au diagnostic sérologique de la toxoplasmose a été proposée en 1957 par GOLDMAN (41), qui a employé l'inhibition de la fluorescence.

Par la suite, KELEN (49), GARIN (36), ZARDI (104) ont adapté au sérodiagnostic de la toxoplasmose la méthode d'immunofluorescence indirecte.

Depuis, plusieurs publications ont été consacrées à cette méthode qui est actuellement adoptée par de nombreux laboratoires travaillant sur la toxoplasmose (32), (98), (37) et (57).

La plupart des auteurs ont travaillé avec des toxoplasmes provenant du liquide d'ascite de souris inoculées en intrapéritonéale, 48 heures ou 72 heures auparavant ; cependant quelques uns ont employé un antigène obtenu sur cultures cellulaires (4) (5) et (97).

L'étude de l'évolution sérologique pratiquée par immunofluorescence au cours de la toxoplasmose expérimentale du cobaye et du lapin a montré que l'épreuve de coloration et la méthode d'immunofluorescence indirecte donnent des résultats

très comparables (37) (15).

La valeur identique de ces 2 réactions est confirmée par les titrages comparatifs - immunofluorescence indirecte, épreuve de coloration - effectués avec de très nombreux sérums humains (37).

e) Test d'hémagglutination indirecte

L'emploi de l'épreuve d'hémagglutination indirecte pour le diagnostic de la toxoplasmose a été proposé par JACOBS et LUNDE (46). L'antigène est préparé à partir du liquide d'ascite de souris infectées, par lyse des toxoplasmes dans de l'eau distillée.

On utilise généralement dans cette réaction des globules rouges de moutons tannés par une solution d'acide tannique à 1/20.000, que l'on sensibilise avec l'antigène, à pH 6,4.

En présence d'un sérum spécifique débarrassé de ses anticorps hétérologues par absorbtion avec des globules non sensibilisés, les globules rouges sensibilisés s'agglutinent.

En 1966 JENNIS (48) a proposé une nouvelle méthode pour sensibiliser les globules rouges, qui fait intervenir l'aldehyde pyruvique.

Depuis les travaux de JACOBS et LUNDE en 1957, cette méthode a été essayée avec succès au cours d'enquêtes séréopidémiologiques (2) et (44).

Avec l'épreuve d'hémagglutination indirecte les titres deviennent positifs (18) (68) et augmentent plus lentement que l'épreuve de coloration ; chez l'homme, cette réaction est appréciée pour le diagnostic des infections chroniques comme la toxoplasmose oculaire (59).

Dans les infections aiguës, elle complète l'épreuve de coloration puisque les anticorps hémagglutinants apparaissent plus lentement.

f) Réaction d'agglutination et de floculation

En 1959, FULTON et TURKS (35) ont décrit une épreuve d'agglutination directe, utilisant comme antigène des toxoplasmes très purifiés.

Par la suite, diverses techniques basées en particulier sur l'usage de particules inertes sensibilisées ont été proposées.

SIIM et LIND (84), puis ENGELBRECHT en 1965 (26) ont présenté des techniques de floculation sur lame. Les premiers utilisaient des particules acryliques, tandis que le second faisait intervenir des microparticules préparées à partir de toxoplasmes brisés par les ultra-sons. DENIS a décrit une épreuve

d'agglutination en tube (24). ROUSSEL a proposé l'utilisation de particules de kaolin et de bentonite (76). LUNDE et JACOBS ont essayé des particules de latex (58).

Les avis sont très partagés sur l'intérêt de ces réactions. Certains auteurs tels que DENIS, LUNDE et JACOBS ne les recommandent pas pour le diagnostic individuel de la toxoplasmose, soit parce qu'ils ont trouvé une corrélation insuffisante avec l'épreuve de coloration, soit parce qu'ils estiment qu'elles manquent de sensibilité ; d'autres au contraire, tels que SIIM, LIND et ENGELBRECHT soulignent le parallélisme très satisfaisant des résultats obtenus avec la réaction de floculation sur lame et l'épreuve de coloration.

g) Réaction de précipitation en milieu gélifié

La réaction de précipitation en milieu gélifié a été essayée par O'CONNOR (67) et STRANNEGARD (90) avec la méthode de double diffusion d'Ouchterlony.

Le nombre très restreint de travaux consacrés à cette technique ne permet pas encore de se prononcer sur la valeur diagnostique de cette méthode.

Il existe une corrélation entre les anticorps précipitants et ceux révélés par la fixation du complément. Par contre, les résultats obtenus avec l'épreuve de coloration et la réaction de précipitation ne sont absolument pas comparables.

2) VALEURS DES METHODES PROPOSEES

Parmi toutes les épreuves sérologiques envisagées pour l'étude de la toxoplasmose chez l'homme, quatre seulement - épreuve de coloration, fixation du complément, hémagglutination indirecte et immunofluorescence indirecte - ont été examinées de façon approfondie au point de vue diagnostique et séroépidémiologique (68).

Chez le chien, deux méthodes seulement ont été vraiment éprouvées : la fixation du complément et l'épreuve de coloration. (69), (70), (63), (1), (31), (53), (64), (10), (73), (28), (74), (79), (9), (43), (11), (61), (45), (52), (101), (3).

A notre connaissance, une seule enquête utilisant l'hémagglutination indirecte a été effectuée au Japon (91).

Jusqu'à la mise au point de l'épreuve d'immunofluorescence indirecte, c'est l'épreuve de coloration qui a été largement utilisée en raison de sa sensibilité et de sa spécificité. Cependant, sa réalisation est difficile. Elle exige, d'une part la manipulation de toxoplasmes vivants, exposant ainsi le personnel de laboratoire à d'éventuelles contaminations ; d'autre part

il faut toujours disposer, en quantité suffisante, d'un facteur accessoire de bonne qualité.

Toutes ces difficultés ont incité les chercheurs à se tourner vers d'autres réactions plus aisées à pratiquer.

La fixation du complément est facile à réaliser, assez spécifique mais peu sensible.

L'hémagglutination indirecte est spécifique, sensible, mais cette technique est assez délicate.

L'immunofluorescence indirecte semble spécifique et très sensible. Les réactifs intervenant dans cette réaction sont faciles à obtenir et ne demandent aucune préparation dans les laboratoires utilisateurs ; aussi doit-elle dans les prochaines années remplacer l'épreuve de coloration.

Sur les autres méthodes utilisées, on dispose de peu de renseignements pour apprécier leur valeur. Ce sont en général des techniques rapides et simples, mais leur spécificité n'est pas toujours optima.

Quelque soit la méthode utilisée, l'appréciation des résultats obtenus est parfois délicate, car on trouve des anticorps chez beaucoup d'individus en bonne santé.

Pour faire le diagnostic sérologique de la toxoplasmose spontanée, il est indispensable d'effectuer deux prises de sang à 15 jours ou 1 mois d'intervalle et d'observer une augmentation notable du titre des anticorps antitoxoplasmiques.

Il est parfois utile de combiner deux réactions sérologiques. En début d'infection ou lors de toxoplasmose chronique, la réaction de fixation du complément peut compléter les renseignements fournis par l'épreuve de coloration, car les anticorps fixant le complément apparaissent plus tardivement et disparaissent plus précocement que les anticorps décelés par l'épreuve de coloration.

-:-:-:-

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE PREMIER

LA CULTURE DE TOXOPLASMA GONDII IN VITRO : UTILISATION DE CETTE TECHNIQUE A LA PREPARATION D'ANTIGENES POUR LE DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DE LA TOXOPLASMOSE

Le toxoplasme est un parasite obligatoirement intracellulaire. Il est habituellement entretenu au laboratoire sur souris. Les souris sont inoculées par voie intrapéritonéale avec du liquide d'ascite ou avec une suspension de cerveau provenant du passage précédent. Après 3 à 10 jours, le liquide d'ascite est prélevé. Si cette méthode donne généralement satisfaction pour l'entretien des souches, on observe que les toxoplasmes ainsi obtenus sont mélangés avec des macrophages, des leucocytes, des globules rouges et des protéïnes étrangères, en particulier des anticorps qui peuvent perturber les réactions sérologiques.

Dans l'impossibilité de cultiver Toxoplasma gondii sur des milieux artificiels, la technique des cultures cellulaires a été expérimentée.

Les premiers travaux décrivant la multiplication du parasite à l'intérieur de cellules cultivées in vitro remontent à 1929 (56).

Les perfectionnements apportés depuis cette époque aux techniques de cultures cellulaires ont permis de cultiver ce parasite sur différents types de cellules (21).

Avec les cellules en lignée continue, type HeLa, l'entretien d'une souche est particulièrement aisée, car, comme l'a montré LUND, LYCKE et SOURANDER (60), un équilibre s'établit entre l'activité mitotique et la destruction cellulaire. Il suffit de changer périodiquement le milieu de croissance pour maintenir la souche.

La facilité avec laquelle le toxoplasme s'est adapté à différents systèmes cellulaires a ouvert de nouvelles perspectives intéressant plus particulièrement l'entretien des souches et la préparation de nouveaux antigènes.

Alors que la congélation du liquide d'ascite de souris infectées contenant essentiellement des parasites extracellulaires est très délicate, il est possible de récupérer Toxoplasma gondii après 13 mois de conservation sur cultures cellulaires à - 196°C.

La virulence de la souche de toxoplasmes ne semble pas être modifiée par le passage sur cultures cellulai-

res. Pendant des périodes allant jusqu'à 33 mois, on a pu entretenir diverses souches de toxoplasmes in vitro sans observer une baisse de la virulence (81), (17), (21), (6).

Quant aux caractères antigéniques, on ignore s'ils sont modifiés par le maintien des toxoplasmes sur cultures cellulaires (15).

1 - LA CULTURE DE TOXOPLASMA GONDII IN VITRO

a) la souche de toxoplasme

Dans toutes nos expériences, nous avons utilisé la souche B_{12} isolée en 1951 par GIROUD à partir du sang d'un malade atteint de toxoplasmose aiguë (40). Cette souche, depuis son isolement, est entretenue par des passages successifs sur souris.

Nous nous sommes servis pendant toute la durée de notre travail de souris blanches de souche MF2 . Au départ nous avons été obligés d'adopter cette souche, car nous n'avions pas d'autres souches à notre disposition. C'est seulement à la fin de nos expériences que nous avons pu comparer ces animaux à d'autres.

Nous avons alors observé que les souris de la souche MAG fournissaient du liquide d'ascite en quantité plus abondante que celles de la souche MF2.

Pour l'entretien de la souche B_{12}, conservée à l'Institut Pasteur de Paris, nous avons adopté la méthode de FRENKEL, légèrement modifiée (34) : 200 000 à 300 000 toxoplasmes dilués dans de l'eau physiologique sont inoculés sous un volume de 0,2 ml par voie intrapéritonéale. Au bout de 3 à 4 jours, avant que la mort des animaux se produise, on prélève l'exsudat péritonéal qui servira à inoculer les souris du prochain passage. Les souris sont ponctionnées à l'aide d'une pipette Pasteur qui, après une désinfection soigneuse de la paroi abdominale, est introduite dans la cavité péritonéale.

Dans le but de faciliter la récolte de l'exsudat péritonéal, nous inoculons à chaque souris 1/4 d'heure avant la ponction 1 ml de liquide d'Alsever par voie intrapéritonéale. La quantité de liquide récolté par cette méthode varie entre 0,5 ml et 2 ml.

Des numérations pratiquées à l'aide d'un hématimètre donnent 10 à 30 x 10^6 toxoplasmes par ml suivant les passages.

b) le système cellulaire

Depuis les travaux de LEVADITI en 1929, de nombreux systèmes cellulaires ont été essayés (4) (21) (6).

Parmi les cellules de premier explant, les cellules de thyroïde humaine, les cellules de rein de veau, de lapin et de singe ont donné de bons résultats.

Reprenant le travail de VIRAT (94), nous avons choisi pour notre première tentative les reins de lapins ; mais en raison, d'une part du temps exigé pour la préparation de ces cellules, d'autre part de leur croissance lente, nous avons préféré utiliser les cellules de lignée.

A la suite des travaux de BETZ (4), WATTRE (97), SCHUOVA (81) et PIERREUX (72), nous avons adopté la lignée HeLa, que nous pouvions facilement nous procurer à Alger.

Cette souche isolée en 1952 par GEY à partir d'un carcinome humain du col de l'utérus est facile à entretenir avec les milieux de croissance usuels (86).

Après avoir essayé divers milieux de croissance et d'entretien (hydrolysat de Lactalbumine, hydrolysat de Caséine, Parker 199), nous avons adopté le milieu de Eagle en sels de Hanks, supplémenté avec des acides aminés non essentiels (25).

Nous avons préparé ce milieu avec des sachets prévus pour 5 litres de milieu et vendus par les Laboratoires Eurobio.

Après addition de bicarbonate 2,2 g/L et contrôle du pH, qui doit être compris entre 7,2 et 7,4, le milieu est filtré sur Millipore 0,22 µ

Nous ajoutons des antibiotiques dans le milieu à raison de 100 UI/ml de pénicilline G et 100 γ /ml de streptomycine. Le milieu de croissance contient 10p. 100 de sérum de veau inactivé à 56° C pendant 30 minutes. Le milieu d'entretien est dépourvu de sérum.

Les cellules sont repiquées à raison de 1,5 million de cellules dans 25 ml de milieu par flacon pharmacie et de 10 millions de cellules dans 100 ml de milieu par boite de Roux.

Le comptage des cellules, effectué avec une cellule Nageotte, est toujours très approximatif, car les cellules HeLa ont tendance à former des agrégats.

c) L'infection des cellules

48 heures, 3 jours au maximum après leur mise en culture, les boîtes de Roux, dès que le tapis cellulaire est complet, sont inoculées avec 2 à 3 x 10^7 toxoplasmes, qui peuvent provenir, soit du liquide d'ascite de souris infectées, soit de cultures précédentes.

Pour éviter les contaminations - surtout fréquentes en été - nous avons préféré remplacer la streptomycine par de la colimycine 100 γ/ml et ajouter de la nystatine 50 υ /ml.

Dès que le milieu s'acidifie, il est préférable de

le remplacer pour freiner la destruction cellulaire.

Vers le 4ème jour, parfois même vers le 3ème jour, on observe les premiers îlots de destruction. Au 5ème jour, le tapis cellulaire est complètement détruit ; les cellules se décollent de la paroi du flacon et le milieu renferme de très nombreux toxoplasmes extracellulaires.

Nous avons constaté, comme le signale BETZ (4), que pour obtenir un nombre élevé de toxoplasmes au moment de la récolte, il est nécessaire d'avoir un inoculum riche renfermant plus de 2×10^7 toxoplasmes.

Au cours de divers essais réalisés en utilisant des inoculums dont la richesse variait entre 2,5 et $3,5 \times 10^7$ toxoplasmes, il a été récolté au cinquième jour dans le surnageant 3 à 4×10^8 toxoplasmes par boîte de Roux.

Nous n'avons jamais atteint les chiffres signalés par BETZ (4), qui obtient avec la même lignée 8 à 9×10^8 toxoplasmes. Cet auteur observe une destruction du tapis cellulaire plus tardive, s'échelonnant du sixième au dixième jour.

Tous les lots que nous avons préparés ont subi des contrôles bactériologiques sur bouillon nutritif et sur Sabouraud liquide incubés à + 33° C et à + 37° C, en particulier pour s'assurer que la destruction du tapis cellulaire n'était pas due à des proliférations microbiennes.

2 - LES METHODES DE PREPARATION DES ANTIGENES

a) Préparation d'un antigène soluble pour la fixation du complément et de l'électrosynérèse

Au cinquième jour, les boîtes de Roux, après avoir fait l'objet d'un contrôle bactériologique, sont réparties dans des flacons cylindriques en Pyrex de 250 ml à raison d'une boîte de Roux par flacon.

En attendant les résultats du contrôle bactériologique, les flacons sont mis au congélateur à - 30° C. Si éventuellement le lot comporte des boîtes contaminées, les flacons correspondants sont éliminés.

Les flacons, après décongélation, sont ensuite congelés à - 60° C en coquille avec le mélange alcool - glace carbonique, dans un appareil à congeler les flacons de plasma. Les flacons sont ainsi congelés à - 60° C, puis décongelés à + 37° C, 5 fois de suite.

L'antigène ainsi préparé selon la méthode de VIRAT (94) est passé sur papier filtre et concentré 50 fois sur un Amicon 402 (§) muni d'une membrane PM 10 (8).

§ *Amicon, 21 Hartwell Avenue, Lexington, Massachussetts 02.173 USA*

Cet appareil est un ultrafiltre fonctionnant sous une pression de 3,5 kg/cm2. La membrane PM 10, qui ne laisse passer que les molécules de PM < 10.000, permet l'éliminer l'eau et toutes les petites molécules, tout en conservant les protéines ; après addition de merthiolate à 1/10.000, l'antigène est réparti en ampoules et congelé à - 30° C.

b) Préparation d'une suspension de toxoplasmes pour l'immunofluorescence indirecte

A partir de toxoplasmes obtenus sur cultures cellulaires, nous avons préparé des suspensions utilisables pour la recherche des anticorps antitoxoplasmiques par la méthode d'immunofluorescence indirecte.

Nous avons essayé la méthode proposée par BETZ (4) (5), qui sépare les toxoplasmes des débris cellulaires par filtration sous aspiration, sur un verre fritté G3 (porosité comprise entre 20 et 40 µ) suivant la technique mise au point par FULTON (35).

Le surnageant des boîtes de Roux inoculées avec les toxoplasmes est récolté le plus précocement possible dès que le nombre de toxoplasmes extracellulaires atteint 2 à 3 x 10^6 par ml, c'est-à-dire vers le quatrième jour. En procédant ainsi, on obtient un liquide surnageant pauvre en débris cellulaires.

Les boîtes sont agitées très doucement avant que le contenu soit filtré. Le filtrat est ensuite centrifugé à 2000 tours/minute pendant 10 minutes, puis le culot est repris dans 50 ml avant d'être à nouveau centrifugé 10 minutes à 2000 tours/minute. Le culot est remis en suspension dans 5 ml d'eau physiologique tamponnée contenant 1p. 100 de formol.

On contrôle ensuite la richesse de la suspension de manière à obtenir au minimum 100 toxoplasmes par champ (objectif 40). Si la suspension est très riche, on peut éventuellement la diluer.

L'antigène est stocké à + 4°C et utilisé 24 heures après sa préparation.

Selon BETZ (4) (5), il se conserve de 1 à 3 mois à + 4°C.

CHAPITRE II

L'ANALYSE IMMUNOELECTROPHORETIQUE ET ELECTROPHORETIQUE D'UN ANTIGENE OBTENU SUR CULTURES CELLULAIRES

1 - L'IMMUNOELECTROPHORESE

L'immunoélectrophorèse est une méthode qui a déjà été utilisée pour fractionner les constituants antigéniques des toxoplasmes provenant de l'exsudat péritonéal de souris infectées.

Les travaux consacrés à cette question sont peu nombreux et les résultats enregistrés sont encore très fragmentaires.

En ce qui concerne les antigènes obtenus sur cultures cellulaires, à notre connaissance aucun travail comparable n'a été effectué.

Nous nous sommes servis de cette technique pour rechercher l'existence de fractions non spécifiques qui diminuent la qualité des antigènes.

Nous avons surtout étudié les fractions issues des protéines de souris, introduites au moment de l'infection des cellules avec le liquide d'ascite.

a) Technique

Nous avons utilisé la microméthode d'analyse immunoélectrophorétique mise au point par SCHEIDEGGER (80).

Les lames porte-objet (76 x 26), soigneusement dégraissées, sont enduites avec 1 ml d'agar noble Difco dilué à 1p. 100 dans de l'eau bidistillée, puis séchées pendant 2 heures à + 80°C.

Nous avons employé le tampon B 2 de Beckman - de pH 8,6 et de force ionique 0,075 - mélangé avec de l'agar dans les proportions suivantes : un volume d'eau bidistillée, deux volumes de tampon, trois volumes d'agar noble Difco.

On obtient une solution d'agar tamponnée à 1,5 p. 100 dont on coule 3 ml par lame.

Après divers essais, nous avons eu recours à une technique décrite par BURTIN et GRABAR (7) qui permet de différencier les fractions non spécifiques des fractions spécifiques. Cette méthode consiste à faire migrer parallèlement deux antigènes entre lesquels on pense qu'il existe des fractions antigéniques communes. On recherche ensuite les arcs dont les extrémités se rejoignent ; ceux dont les extrémités se recoupent parfaitement sont identiques.

Les immun-sérums et les antigènes sont déposés sur les plaques de gélose à l'aide de pipettes Pasteur effilées et réétirées. L'électrophorèse s'effectue sur un appareil Beckman dont la cuve est remplie avec du tampon B 2 non dilué. Elle dure 80 minutes. La différence de potentiel maintenue toujours constante aux bornes du redresseur est de l'ordre de 200 volts pour un courant dont l'intensité initiale est de 35 mA. On laisse ensuite diffuser en chambre humide pendant 24 ou 48 heures, puis les lames sont lavées 3 jours de suite dans de l'eau physiologique renouvelée 2 fois par jour. Après un lavage 10 minutes dans de l'eau bidistillée, les lames recouvertes d'un papier Whattman humide sont séchées à + 37°C. Après un nouveau rinçage à l'eau bidistillée, les lignes de précipitation sont révélées à l'amidoschwartz 10 B.

REACTIFS

a) Solution pour coloration

Amidoschwartz 10 B	1,00 g
Acide acétique pur cristallisé	100 ml
Néthanol à 100°	700 ml
Eau bidistillée	950 ml

b) Solution pour différenciation

Acide acétique pur cristallisable	50 ml
Eau bidistillée	950 ml

c) Tampon à p H 8,6 (Tampon B_2 de Beckman)

Acide diethylbarbiturique	2,76 g
Diethylbarbiturate de Sodium	15,40 g
Eau bidistillée	1000 ml

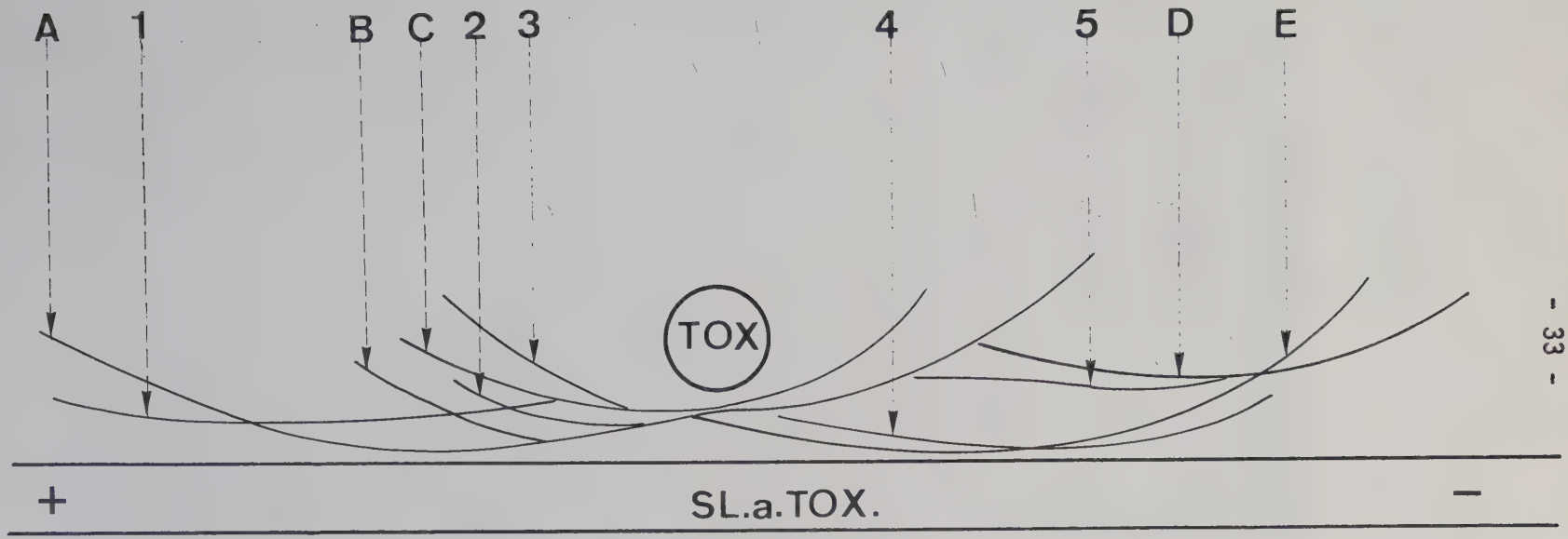

Fig. 1 : IMMUNOELECTROPHORESE DE TOXOPLASMA GONDII CULTIVE SUR CELLULES HeLa

A, B, C, D, E : Fractions non spécifiques

1, 2, 3, 4, 5 : Fractions spécifiques

IMMUNOELECTROPHORESE SIMULTANEE DE TOXOPLASMA GONDII
CULTIVE SUR CELLULES HeLa ET D'UN MELANGE DE SERUM DE SOURIS

Fig. 2

a : Sérum de lapin antisouris
b : Sérum de souris
c : Toxoplasme
d : Sérum de lapin antitoxoplasme

Les antigènes

Au cours de ce travail nous avons employé trois antigènes :

- un mélange de sérum de souris provenant d'une dizaine d'animaux,
- un antigène soluble utilisé pour la réaction de fixation du complément et de l'électrosynérèse,
- un antigène témoin préparé en même temps que le précédent et exactement dans les mêmes conditions, mais dépourvu de toxoplasmes.

Les immum-sérums

Nous avons préparé un immum-sérum antitoxoplasme suivant la méthode préconisée par VIRAT (94).

Le liquide d'ascite est prélevé 3 jours après l'inoculation des toxoplasmes chez la souris ; il est dilué au 1/20, puis placé en couche mince dans une boîte de Pétri sous une lampe germicide à environ 30 cm de celle-ci pendant 5 minutes ; 2 ml de cette suspension atténuée sont inoculés au lapin par voie sous-cutanée.

L'opération est répétée 3 fois à une semaine d'intervalle ; les toxoplasmes n'étant plus pour la troisième injection inactivés que pendant 2 minutes.

Trois semaines après la troisième injection, on inocule à l'animal par voie intra-dermique 0,5 ml de la suspension de toxoplasmes non inactivés ; il se forme un petit nodule au point de l'inoculation. On saigne l'animal une semaine après ; le sérum récolté est conservé à - 20°C en attendant d'être titré, car tous les sérums de mauvaise qualité sont éliminés.

Nous avons utilisé comme sérum anti-souris, le sérum de lapin antiglobuline de souris, commercialisé par l'Institut Pasteur de Paris.

b) Résultats et discussion

L'analyse immunoélectrophorétique de l'antigène que nous avons préparé sur cultures cellulaires nous a permis de mettre en évidence 10 arcs. Sur ces 10 fractions, nous pensons que seulement 5 fractions sont vraiment spécifiques et que les autres viennent sans doute des protéines introduites au moment de l'infection des cellules avec l'ex-

sudat péritonéal de souris.

Nous avons essayé le sérum antitoxoplasme contre l'antigène témoin, mais sans observer l'apparition d'arcs de précipitation.

Il est peu probable, dans ces conditions, que les protéines provenant de la destruction des cellules HeLa interfèrent dans la formation des arcs correspondant aux fractions considérées comme non spécifiques.

Par rapport aux travaux précédents qui ne concernent que des antigènes obtenus selon des méthodes classiques, le nombre des fractions mises en évidence dans cet antigène est sensiblement le même.

En 1964 CHORDI, WALLS et KAGAN (19), étudiant 3 types d'antigènes, ont démontré l'existence de 4 fractions d'origine parasitaire et de 2 autres fractions encore d'origine douteuse.

En 1969 WATTRE (97) a démontré 6 arcs représentant des fractions antigéniques distinctes, spécifiques du toxoplasme et n'ayant plus aucun rapport avec les constituants de l'hôte.

Si nous nous référons aux travaux de CHORDI, WALLS et KAGAN (19), qui ont étudié très soigneusement la constitution antigénique des toxoplasmes obtenus sur souris, il semble que les fractions 4 et 5 ont une mobilité électrophorétique comparable aux β 2 globulines du sérum de souris. Les fractions 2 et 3 sont dans la zone des α 2 et des β 1 globulines ; quant à la fraction 1, il est difficile de savoir si elle est dans la zone des α 1 ou des albumines, car nous avons utilisé un sérum de lapin antiglobuline de souris qui se révèle incapable de déceler les albumines contenues dans le sérum de souris.

La plupart des lignes sont assez faibles, à l'exception de l'arc 3 qui s'identifie peut-être à la fraction 3, constamment mise en évidence par CHORDI, WALLS et KAGAN (19) dans la zone des α 2 et des β 1 globulines et qui serait un des constituants antigéniques importants du toxoplasme.

2 - ELECTROPHORESE

Nous nous sommes intéressés à l'électrophorèse dans la perspective d'utiliser ultérieurement cette méthode pour l'obtention de fractions hautement purifiées.

Nous avons étudié simultanément deux types d'échantillons : l'antigène soluble et l'antigène témoin.

Du fait de la présence de phénolphtaléine dans le milieu d'entretien, nous n'avons pas pu utiliser la mé-

thode du Biuret pour doser les protéines.

Nous avons dû travailler avec des solutions concentrées approximativement de la même façon, car nous n'avions pas d'autres méthodes de dosage à notre disposition.

Cette difficulté nous a empêchés de tirer des renseignements d'ordre quantitatif des enregistrements que nous avons effectués. (Tableau I).

a) Technique

Pour obtenir les électrophorégrammes, nous avons adopté l'appareillage de Beckman avec système de microzone, sur acétate de cellulose.

Avec cette technique on peut étudier simultanément 8 échantillons qui sont déposés sur la membrane avec un applicateur à raison de 0,50 microlitre par échantillon.

Nous avons utilisé le tampon B 2 de Beckman, de pH 8,6 et de force ionique 0,075. Le potentiel choisi est de 250 V à tension constante pendant une durée de 20 minutes.

La coloration des bandes est faite au ponceau S, acide trichloracétique, acide sulfosalicylique et le rinçage en solution d'acide acétique alcoolisé suivant la technique décrite dans la notice fournie par Beckman.

La membrane préalablement colorée est analysée qualitativement et quantitativement à l'aide de l'Analytrol R.B. Beckman, réglé à la vitesse de 30 mm/minute avec intégration automatique (1 dent = 0,1 cm2)

b) Résultats et discussion

L'étude comparative des deux diagrammes nous permet de constater que l'antigène soluble comporte 5 factions alors que l'antigène témoin n'en comporte que 4.

Nous pensons que l'absence de la fraction équivalente à la fraction E sur la courbe témoin n'est pas significative. Il est probable que les deux antigènes n'ont pas la même concentration en protéines et que cette différence est à l'origine de la disparition de cette fraction sur la courbe témoin.

Les modifications du tracé observées au niveau des fractions C, D, C' et D' entre l'antigène soluble et l'antigène témoin sont certainement d'ordre qualificatif et en liaison avec la présence des toxoplasmes dans l'antigène soluble.

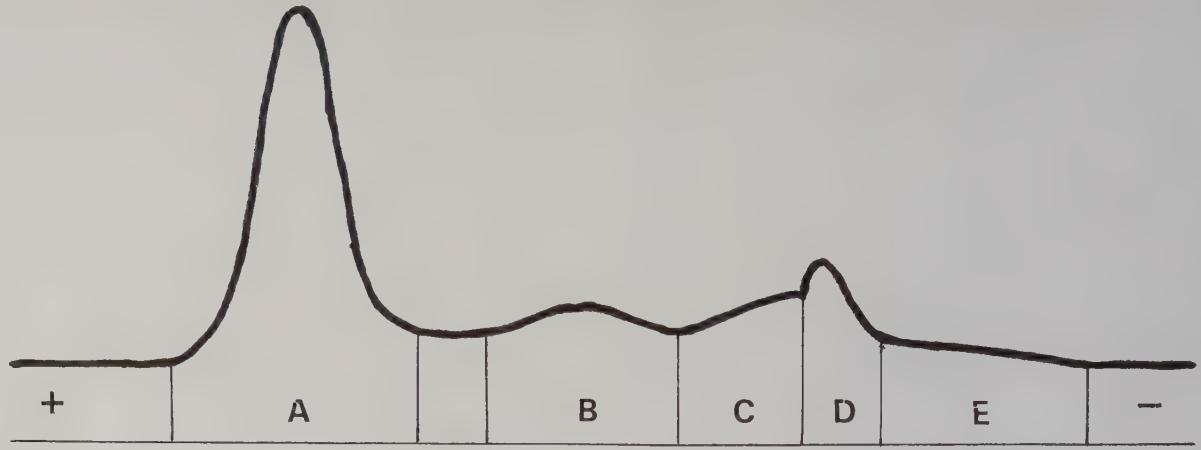

Fig. 3 ELECTROPHORESE DE TOXOPLASMA GONDII CULTIVE SUR CELLULE HeLa

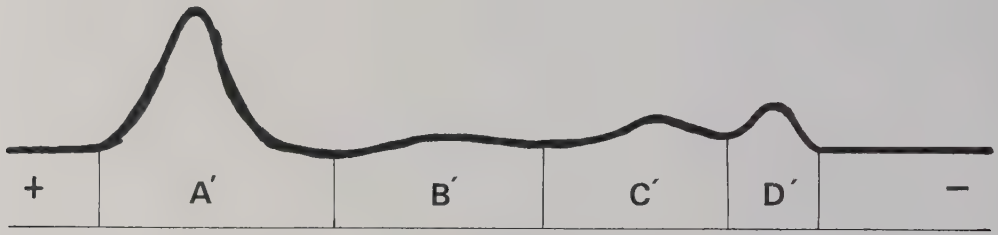

Fig. 4 ELECTROPHORESE DE L'ANTIGENE TEMOIN

Tableau I

Les fractions protidiques dans l'antigène témoin et dans l'antigène préparé avec des toxoplasmes cultivés sur cellules HeLa :

(en pour cent des protides totaux)

Fractions	A'	B'	C'	D'
Antigène témoin	66	7,5	15,2	11,5

Fractions	A	B	C	D	E
Antigène Tox sur Cellules HeLa	59,5	16,5	11,6	7,7	4,6

3 - CONCLUSION

L'analyse immunoélectrophorétique et électrophorétique de l'antigène de Toxoplasma gondii préparé sur cellules HeLa nous ont permis de mettre en évidence l'existence de 5 fractions.

Nous ne savons pas cependant s'il existe une identité entre les fractions révélées par ces deux méthodes.

L'immunoélectrophorèse a montré que l'antigène contient des fractions non spécifiques, issues des protéines étrangères introduites au moment de l'infection des cellules par le liquide d'ascite de souris infectées.

Il est probable qu'en modifiant la technique de préparation de l'antigène et en utilisant des méthodes de fractionnement, nous pourrions obtenir un antigène très purifié et hautement spécifique.

CHAPITRE III

ENQUETE EPIDEMIOLOGIQUE

1 - MATERIEL et METHODES

Les chiens qui ont servi à cette enquête provenaient de la fourrière municipale de la ville d'Alger. Ils étaient gardés dans les chenils de l'Institut Pasteur d'Algérie pour les contrôles d'innocuité et d'efficacité du vaccin antirabique à usage vétérinaire, Flury HEP. La plupart pesaient de 15 à 25 kg. Ils étaient d'âge variable, mais aucun n'avait moins de 6 mois.

Sur ces animaux nous avons prélevé 10 ml de sang par ponction à la veine jugulaire.

Après coagulation à l'étuve à + 37°C pendant 1 heure, les tubes ont été laissés une nuit à + 4°C, avant d'être centrifugés à 3000 tours/minute pendant 10 minutes dans une centrifugeuse angulaire. Les sérums ont été décantés aseptiquement et répartis en ampoules avant d'être placés au congélateur à - 20°C.

a) Technique d'immunofluorescence indirecte

On utilise des lames en verre blanc pour l'histologie, soigneusement dégraissées (76 x 26), dont l'épaisseur varie entre 8 et 10/10, sur lesquelles on grave à l'aide d'un diamant 3 cercles de 5 à 10 m/m de diamètre.

Une goutte de l'antigène préparé sur cultures cellulaires suivant la méthode précédemment décrite est déposée à l'intérieur des cercles à l'aide d'une pipette Pasteur réétirée. Après séchage 1/2 heure à + 37°C, les lames sont conservées à - 20°C.

Avant l'examen, les lames sont sorties du congélateur ; après séchage, elles sont fixées à l'acétone pendant 10 minutes à la température du laboratoire.

Les dilutions du sérum à examiner sont pratiquées dans de l'eau physiologique tamponnée à pH 7,2 au 1/20, 1/100, 1/200. Si le sérum se révèle positif, le titrage est poursuivi en diluant celui-ci au 1/400, 1/1000 au 1/2000.

Une goutte de sérum dilué est déposée au centre du cercle gravé contenant la suspension de toxoplasmes fixés. Le sérum est laissé ainsi en contact avec l'antigène pendant

une demi-heure à + 37°C. Les lames sont placées dans une grande boîte de Pétri dont le fond est recouvert de gaze imbibée d'eau pour éviter la dessication. Au bout de 30 minutes, les lames sont lavées avec un jet de pissette d'eau tamponnée, puis placées successivement pendant 5 minutes dans deux bacs d'eau physiologique tamponnée.

Après avoir essuyé soigneusement les lames en évitant de toucher l'intérieur des cercles, on dépose une goutte du conjugué fluorescent antiglobuline de chien.

Nous avons utilisé le sérum de lapin fluorescent antiglobuline de chien de l'Institut Pasteur de Paris dilué au 1/100.

On laisse agir le conjugué pendant une demi-heure à + 37°C en procédant de la même façon que précédemment.

Après un rinçage à la pissette, les lames sont essuyées soigneusement, puis placées pendant 10 minutes dans un bac contenant du bleu Evans dilué au 1/10.000. Après lavage et rinçage deux fois pendant 5 minutes dans de l'eau physiologique tamponnée, les lames sont essuyées avant de déposer une goutte de glycérine tamponnée à l'intérieur des cercles que l'on recouvre avec une lamelle propre.

On prépare pour chaque série de sérums étudiés un sérum témoin positif, un sérum témoin négatif et un témoin antigène où le sérum est remplacé par une goutte d'eau tamponnée pour s'assurer que le conjugué fluorescent ne réagit pas avec l'antigène.

La lecture des lames se fait au microscope à fluorescence. (Microscope Leitz Laborlux, brûleur HB 200 W, condensateur à fond noir, oculaire (x10), objectif à sec (x 40), filtre excitateur BG 12 de 1,5 m/m, filtre d'arrêt K 530).

Quand la réaction est positive, les toxoplasmes sont colorés en rouge par le bleu Evans, tandis que la périphérie apparait fortement fluorescente. La limite de la réaction se lit par disparition de la fluorescence périphérique.

REACTIFS

a) Eau physiologique tamponnée pH 7,2

NaCL	8 g
$Na_2 H PO_4, 12 H_2O$	2,7 g
$Na H_2 PO_4, 2 H_2O$	0,4 g
Eau distillée	1000 ml

b) Glycérine tamponnée pH 7,8

$KH_2 PO_4$	0,136 g
$Na_2 H PO_4, 12 H_2O$	3,221 g
Eau distillée	20 ml
Glycérine bidistillée	80 ml

b) Réaction de fixation du complément

Nous avons adopté une technique de type Kolmer sur plaque en plexiglas dite "plaque à hémagglutination de l'OMS". Ces plaques comportent 80 cupules.

Nous avons exécuté cette réaction suivant une méthode décrite dans le cours d'Immunologie générale et de Sérologie de l'Institut Pasteur de Paris (22).

Tous les réactifs sont utilisés dans les mêmes conditions que dans la technique en tubes, mais le sérum, l'antigène, le complément, le sérum hémolytique et les globules rouges sont introduits à la dose de 0,05 ml ; les quantités sont mesurées à l'aide d'une pipette Duclaux.

Les sérums de chiens sont décomplémentés à + 56°C pendant 30 minutes.

Le diluant utilisé est le tampon au Véronal de Mayer contenant des cations Ca++ et Mg++.

TAMPON VERONAL à pH 7,2

- NaCl	85 g
- Acide 5,5 Diethylbarbiturate de sodium	3,75 g
- Acide 5,5 Diethylbarbiturique	5,75 g
- $CaCl_2$	0,28 g
- $Mg\ Cl_2, 6H_2O$	1,68 g
- Eau distillée	2000 ml

Filtrer sur Millipore 0,22µ. Conserver à + 4°C. Diluer 5 fois dans de l'eau distillée au moment de l'emploi.

Titrage du complément :

Le titrage du complément se fait le matin même du jour où l'on effectue la réaction.

Dans les tubes, on répartit le complément dilué généralement au 1/20 et le tampon dans les proportions suivantes :

N° des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
C' au 1/20	0,20	0,22	0,24	0,26	0,28	0,30	0,33	0,36	0,40	0,45	0,50
Tampon	0,30	0,28	0,26	0,24	0,22	0,20	0,17	0,14	0,10	0,05	0

A l'aide d'un compte-gouttes Duclaux on distribue une goutte du contenu de chaque tube dans les cupules d'une plaque OMS, puis on ajoute 2 gouttes de tampon. La plaque est ensuite laissée une heure à + 37°C. En effet, la destruction du complément observée pendant cette période correspond à la perte d'efficacité provoquée par un séjour à + 4°C pendant une nuit (55).

N° des cupules	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
C' dilué	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
Tampon	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II

Placer 1 heure à 37°C

Syst. Hémolytique	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II

Placer 1 heure à 37°C

Après addition du système hémolytique on prépare un témoin globules rouges (1 goutte GR à 4p 100 pour 4 gouttes de tampon), un témoin du système hémolytique à 1/500 + 3 gouttes de tampon), un témoin hémolyse 100 p 100 (5 gouttes du mélange : GR 4p 100 1 ml - Eau distillée 4 ml). La cupule qui présente une hémolyse 100 p 100 contient une unité de complément sous un volume de 0,05 ml.

L'antigène est préparé sur cellules HeLa suivant la technique précédemment décrite et 2 unités antigéniques interviennent dans la réaction.

Le complément est du sérum de cobaye lyophilisé, commercialisé par l'Institut Pasteur de Paris. 2 unités hémolyse 100 p 100 sont utilisées dans la réaction.

Le système hémolytique est constitué par une suspension de globules rouges de mouton à 4 p 100 et par le sérum hémolytique standard de l'Institut Pasteur de Paris au 1/500.

Les globules rouges sont recueillis sur une solution d'Alsever à raison d'un volume de sang pour un volume d'Alsever et placés à + 4°C.

Les globules rouges ne sont utilisés que 24 heures après leur récolte.

Le mélange Alsever - globules rouges - est centrifugé 10 minutes à 2000 tours/minute dans une centrifugeuse horizontale.

Le culot globulaire est ensuite repris 3 fois dans de l'eau physiologique. Les globules rouges sont sensibilisés en mélangeant un volume de globules rouges à 4 p 100 à un volume de sérum hémolytique à 1/500 dix minutes avant leur emploi.

La fixation s'effectue à basse température (+ 4°C) pendant la nuit.

L'hémolyse 100 p 100 sert à apprécier le titre de sérum.

Titrage de l'antigène :

Le titrage de l'antigène s'effectue en présence d'un sérum immun spécifique de lapin préparé suivant la méthode de VIRAT (94).

Le sérum immun et l'antigène sont dilués suivant une progression géométrique de base 2.

Les dilutions du sérum vont de 1/16 à 1/1024. Celles de l'antigène de 1/50 à 1/6400.

Le titrage de l'antigène se fait en échiquier.

Les réactifs sont répartis dans les cupules à raison d'une goutte de sérum dilué, d'une goutte de complément (2unités dans 0,05 ml) et d'une goutte d'antigène dilué.

La fixation dure une nuit à + 4°C. On prépare, comme dans le titrage du complément, un témoin globules rouges, un témoin sérum hémolytique et, pour chaque dilution du sérum et de l'antigène, un témoin pour s'assurer que l'antigène et le sérum ne sont pas anticomplémentaires.

La lecture de la plaque s'effectue à l'aide d'une échelle d'hémolyse préparée en mélangeant les solutions suivantes :

- Solution A : suspension des globules rouges à 0,8 %
  - globules rouges à 4 % - 1 ml
  - tampon - 4 ml

- Solution B : solution d'hémoglobine correspondant à la suspension ci-dessus. La lyse des globules rouges est obtenue par action de l'eau distillée, puis le milieu est isotonisé par l'addition du NaCl concentré 20 fois.
  - globules rouges à 4 % - 1 ml
  - eau distillée 3,8 ml
  - NaCl à 17 % 0,2 ml

Dans une série de tubes on effectue les mélanges suivants :

A	1	0,75	0,50	0,25	0,10	0
B	0	0,25	0,50	0,75	0,90	1
Hémolyse %	0	25	50	75	90	100
Notation	H_0	H_{25}	H_{50}	H_{75}	H_{90}	H_{100}

Puis, on dépose dans les alvéoles 5 gouttes du contenu de chaque tube. Après une heure de sédimentation, on observe. On retiendra l'alvéole contenant la dilution d'antigène donnant une fixation complète du complément en présence de la dilution de sérum la plus élevée. Dans cette alvéole il y a une unité d'antigène.

Dans la réaction proprement dite, on utilise 2 unités antigéniques.

Sérum de Référence	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	Témoin antigène
1/50	H_{75}	H_{90}	H_{100}	H_{100}	H_{100}	H_{100}	H_{100}	H_{100}
1/100	H_{75}	H_{90}	H_{100}	H_{100}	H_{100}	H_{100}	H_{100}	H_{100}
1/200	H_{50}	H_{75}	H_{100}	H_{100}	H_{100}	H_{100}	H_{100}	H_{100}
1/400	H_{25}	H_{50}	H_{75}	H_{75}	H_{100}	H_{100}	H_{100}	H_{100}
1/800	H_{25}	H_{50}	H_{75}	H_{100}	H_{100}	H_{100}	H_{100}	H_{100}
1/1600	H_{90}	H_{100}	H_{100}	H_{100}	H_{100}	H_{100}	H_{100}	H_{100}
1/3200	H_{100}	H_{100}	H_{100}	H_{100}	H_{100}	H_{100}	H_{100}	H_{100}
1/6400	H_{100}	H_{100}	H_{100}	H_{100}	H_{100}	H_{100}	H_{100}	H_{100}
Témoin Sérum	H_{100}	H_{100}	H_{100}	H_{100}	H_{100}	H_{100}	H_{100}	

Les résultats des différents titrages d'antigène que nous avons effectués nous ont permis de constater que le sérum de référence était encore légèrement anticomplémentaire au 1/16, mais que l'antigène, par contre, était totalement dépourvu de pouvoir anticomplémentaire.

Le lot d'antigène utilisé au cours de ce travail décelait jusqu'au 1/400 des traces d'anticorps dans le sérum de lapin dilué au 1/128.

Ne disposant pas d'un sérum de chien positif en fixation du complément, nous avons commencé notre enquête en utilisant 2 unités d'antigène titrées contre le sérum de lapin de référence.

Après avoir testé plus de 70 sérums, nous avons trouvé un seul sérum positif au 1/4. Surpris par ce résultat,

nous avons titré à nouveau notre antigène contre ce sérum de chien. Nous nous sommes alors aperçus qu'il fallait 10 unités antigéniques titrées vis à vis d'un sérum de lapin de référence pour que la réaction soit à sa sensibilité optima chez les chiens.

Avec des sérums humains titrés avec un antigène obtenu sur cellules de rein de lapin, VIRAT a observé, dans des conditions expérimentales semblables, le même phénomène (94).

La réaction proprement dite :

La recherche des anticorps fixant le complément s'effectue sur des sérums de chiens dilués au 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32. le pouvoir anticomplémentaire de chaque dilution est éprouvé, car nous avons pu constater que quelques sérums de chiens étaient fortement anticomplémentaires.

On considère encore comme positifs les sérums dilués au 1/2, pour lesquels l'inhibition de l'hémolyse en présence d'antigène est au moins de 50 p 100.

c) L'électrosynérèse

La recherche des anticorps précipitants dans le sérum ou l'humeur aqueuse des malades atteints de toxoplasmose aiguë ou congénitale par la technique de double diffusion d'Ouchterlony a fait l'objet de deux publications de O'CONNOR (67) et STRANNEGARD (90).

Nous avons essayé de rechercher les anticorps précipitants à l'aide d'une technique plus rapide, combinant simultanément l'électrophorèse et la précipitation immunologique dans le gel : l'électrosynérèse.

Cette technique mise au point par BUSSARD et HUET (12) a été peu expérimentée (23) (103) et elle n'a jamais servi, à notre connaissance, au diagnostic de la toxoplasmose.

L'antigène dont la mobilité est suffisamment différente de celle de l'anticorps est amené à rencontrer les anticorps sous l'action d'un champ électrique dans des conditions de pH telles que leurs mobilités respectives soient de sens inverse.

L'antigène migre sous l'action du champ électrique vers l'anode et les immunoglobulines en direction de la cathode, sous l'influence de l'électroendosmose.

L'électroendosmose est le déplacement de la solution d'électrolyte vers la cathode. Le gel qui sert de support contient des groupements carboxyles négatifs à des pH neutres ou alcalins. Ce support étant fixe, c'est le liqui-

de qui se déplace en entraînant avec lui, vers le pôle négatif, tous les constituants soumis à l'analyse.

Ce courant électrodosmotique dépend du choix des supports et augmente pour des forces ioniques plus faibles ou des pH plus alcalins du tampon qui entre dans la constitution du gel.

Sous l'effet de ce phénomène on observe un déplacement réduit des anions fortements chargés vers l'anode, tandis que les anions faiblement chargés peuvent migrer vers la cathode, ce qui est le cas des immunoglobulines.

Quand l'antigène et les anticorps migrant respectivement vers l'anode et la cathode se rencontrent, il se forme un complexe insoluble qui précipite.

La durée de l'électrophorèse ne modifie pas la position de la ligne de précipitation ; en effet, le complexe insoluble reste emprisonné dans les mailles du réseau formé par le gel. La ligne de précipité se forme même lorsque l'antigène ou l'anticorps se trouvent loin des proportions optima (103).

Technique

Pour mettre au point cette méthode nous avons repris la technique que nous avions utilisée pour l'immunoélectrophorèse, en modifiant cependant les dispositions des réservoirs et la tension aux bornes du redresseur.

Les godets de 2mm de diamètre sont remplis à l'aide de pipettes Pasteur effilées et réétirées ; puis, les lames sont placées sur une cuve Beckman soumise à une tension constante de 145 volts pour une intensité initiale de 30 m A pendant 30 minutes.

Les lames peuvent être immédiatement examinées, mais nous pensons qu'il est préférable de les laver et de les colorer pour éviter toutes les erreurs d'interprétation.

Pour chaque série de lames nous avons préparé un témoin positif constitué par un sérum de lapin antitoxoplasme.

Nous avons également pris soin de contrôler tous les sérums de chiens positifs en présence de l'antigène témoin qui avait déjà servi pour l'immunoélectrophorèse. Nous n'avons observé aucune réaction croisée entre les sérums de chien et les protéines provenant des cellules HeLa.

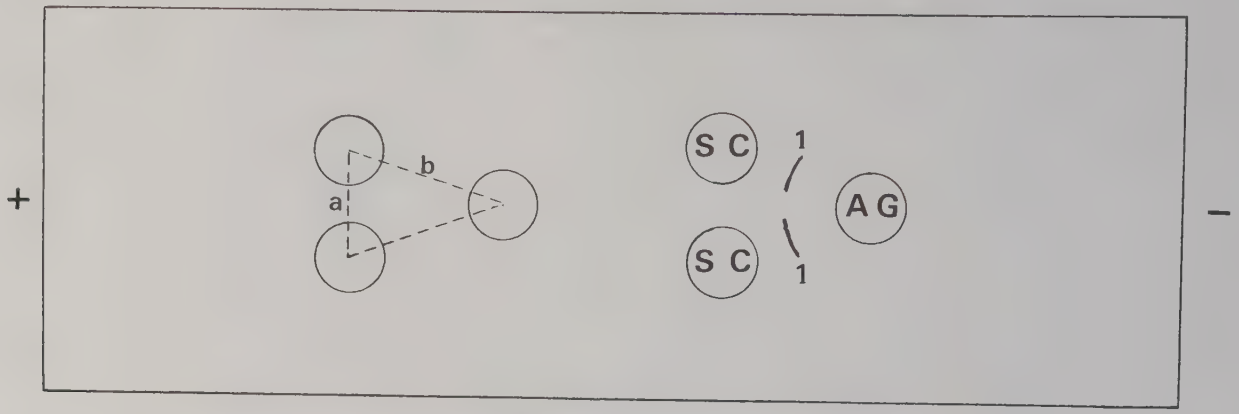

Fig. 5 **DESSIN SCHEMATIQUE D'UNE LAME D'ELECTROSYNERESE**

a : 5 mm b : 10 mm 1 : ligne de précipitation

S.C : Sérum de chien Ag: Antigène

2 - RESULTATS

En utilisant des antigènes d'origine cellulaire, nous avons pu étudier, sur un groupe de 105 chiens en bonne santé, 105 sérums en immunofluorescence indirecte et 52 sérums en fixation du complément et en électrosynérèse.

Nous présenterons les résultats fournis par cette enquête sous deux rubriques :

a) les résultats généraux
b) étude comparative des résultats obtenus par ces trois techniques

a) les résultats généraux

Sur 105 sérums examinés en immunofluorescence indirecte, 47 se sont révélés positifs à des titres allant du 1/20 au 1/1000 - (tableau II)

A l'exception d'un seul chien dont le sérum était positif au 1/1000, les titres ne dépassaient pas le 1/200 ; le même chien éprouvé 8 mois plus tard révélait un titre de 1/20.

Sur 52 sérums titrés en fixation du complément (tableau III) un seul s'est révélé anticomplémentaire. 29,5 % de ces animaux possèdaient un titre en anticorps variant entre le 1/2 et le 1/32, alors qu'avec la technique d'électrosynérèse nous avons observé 12 sérums positifs sur 52, soit un taux de positivité de l'ordre de 23 % (tableau IV).

b) étude comparative

D'une façon générale l'étude comparative des titres obtenus en immunofluorescence indirecte et en fixation du complément (tableau V) permet d'établir qu'il existe une bonne corrélation entre les deux groupes de résultats. Les titres en fluorescence sont en générale beaucoup plus élevés que ceux relevés en fixation du complément.

Dans le tableau IV sont inclus 26 sérums qui se sont révélés positifs au moins à l'une des trois réactions sérologiques.

L'analyse de ce tableau permet de se rendre compte, d'une part que les sérums positifs en immunofluorescence indirecte le sont également en électrosynérèse, d'autre part qu'il existe une très mauvaise corrélation entre cette dernière technique et la fixation du complément, car sur 12 sérums révélant des anticorps précipitants en électrosynérèse, 4 seulement sont positifs en fixation du complément.

Résultats de l'immunofluorescence indirecte pratiquée sur 105 sérums de chiens

Tableau II

Sérums négatifs au 1/20	Sérums positifs au 1/20	Sérums positifs au 1/100	Sérums positifs au 1/200	Sérums positifs 1/1000	Nombre total de sérums
§ 58	29	12	5	1	105
% 55,3	27,7	11,4	4,7	0,9	100

§ : nombre de sérums examinés
% : pourcentage

Résultats de la fixation du complément pratiquée sur 52 chiens

Tableau III

sérums négat. 1/2	sérums posit. 1/2	sérums posit. 1/4	sérums posit. 1/8	sérums posit. 1/16	sérums posit. 1/32	nombre total de sérums
§ 36	1	1	6	5	2	51 =
% 70,5	1,9	1,9	11,8	9,9	3,9	100

= sur les 52 sérums examinés un seul s'est révélé anticomplémentaire

§ : nombre de sérums examinés
% : pourcentage

Résultats de l'enquête pratiquée avec la technique d'électrosynérèse sur 52 sérums de chiens

Tableau IV

	Sérums négatifs	Sérums positifs	Nombre total de Sérums
Nombre de sérums examinés	40	12	52
Pourcentage	77	23	100

Etude comparative des anticorps fluorescents et fixant le complément

Tableau V

Dilution des sérums	y1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	Nombre total de sérums
x 1/20	1	1	4	1		7
1/100			1	3		4
1/200			1	1	2	4
Nombre total de sérums	1	1	6	5	2	15

x : Immunofluorescence indirecte

y : Fixation des compléments

Etude comparative des anticorps fluorescents, fixant le complément et précipitants (technique d'électrosynérèse)

Tableau VI

N° du chien	Electrosynérèse	Titre en fixation du complément	Titre en immunofluorescence indirecte
301	+	-	1/100
303	-	1/8	1/20
314	+	1/16	1/20
323	+	-	1/100
324	-	-	1/20
325	+	-	1/100
326	-	1/2	1/20
327	+	-	1/20
328	+	1/16	1/200
329	-	1/8	1/200
330	-	1/16	1/100
332	+	-	1/20
334	-	1/16	1/100
336	+	1/32	1/200
341	+	-	1/200
348	-	1/32	1/200
349	+	-	1/20
315	-	1/8	1/20
110	+	-	1/20
109	-	1/16	1/100
100	-	1/8	1/20
95	-	-	1/20
94	-	1/4	1/20
90	-	1/8	1/20
86	-	-	1/100
82	+	1/8	1/100

RESULTATS DES ENQUETES SEROLOGIQUES EFFECTUEES DANS DIFFERENTS PAYS POUR RECHERCHER LES CHIENS PORTEURS D'ANTICORPS ANTITOXOPLASMIQUES

Tableau VII

Référence	Pays	Nombre de chiens examinés	SERUMS POSITIFS		
			Epreuve de Coloration	Fixation du Complément	Hémagglutination indirecte
OTTEN (70) 1950	Allemagne	84	36 %		
OTTEN (69) 1952	Allemagne	164		71,9 %	
MILLER (63) 1953	U.S.A.	51	59 %		
BALOZET (1) 1955	Algérie	105		30 %	
FELDMAN (31) 1956	U.S.A.	132	43,1 %		
LAINSON (53) 1956	Angleterre	113		42,5 %	
MORRIS (64) 1956	U.S.A.	180		25 %	
BORGEN (10) 1957	Norvège	200	44,5 %		
ROEVER-BONNET (73) 1958	Pays-Bas	75	8 %		

Tableau VII (suite)

Référence	Pays	Nombre de chiens examinés	SERUMS POSITIFS		
			Epreuve de Coloration	Fixation du Complément	Hémagglutination indirecte
EYLES (28) 1959	U.S.A.	800	21,2 %		
SATO (79) 1960	Japon	69	27,5 %		
BOCH (9) 1963	Allemagne	929	87,1 %	21,5 %	
GROULADE (43) 1963	France	450	47 %		
BURI (11) 1964	Allemagne	204	90 %		
MAC CULLOCH (61) 1964	U.S.A.	112	16 %		
ISHU (45) 1966	Japon	222 164	22 % 42 %		
KUIL (52) 1966	Surinam	137	47 %		
UCHINUNO (91) 1967	Japon	253			29 %
WORK (101) 1969	Danemark	954	42,5 %		
BEN RACHID (3) 1970	Tunisie	200 2	71 %		

3) Discussion

De cette enquête il ressort que la toxoplasmose est dans l'Algérois une infection très répandue.

Nos résultats confirment parfaitement ceux rapportés par BALOZET en 1955 (1). Comparés avec les pourcentages relevés au cours des enquêtes effectuées depuis une vingtaine d'années et figurant dans le tableau VII , la proportion des réactions positives observées à Alger n'est pas exceptionnelle. La disparité des résultats, qui est en relation avec la diversité des protocoles utilisés, nous empêche de savoir si les chiens de l'Algérois sont plus lourdement infectés que ceux d'autres régions.

Parmi les 3 méthodes que nous avons essayées, c'est la technique d'immunofluorescence indirecte qui s'est révélée la plus sensible.

Elle semble bien adaptée aux enquêtes épidémiologiques, en raison de la sensibilité et de la facilité avec laquelle elle peut être mise en oeuvre.

Quant à sa spécificité, comme nous ne possédons à l'heure actuelle aucune donnée sur l'utilisation de la réaction d'immunofluorescence indirecte chez le chien, nous sommes obligés de faire appel aux titrages comparatifs effectués sur des milliers de sérums humains par immunofluorescence indirecte et par le test de lyse des toxoplasmes.

GARIN (37) qui a testé plus de 1000 sérums et qui s'appuie également sur les travaux de divers auteurs, français et étrangers, pense que la réaction d'immunofluorescence indirecte est d'une valeur identique au test de lyse des toxoplasmes.

Parmi les animaux présentant des anticorps décelables par immunofluorescence indirecte un chien a retenu notre attention, car il possédait un titre d'anticorps de 1/1000 alors qu'il était en parfaite santé.

Il est probable que cet animal avait été contaminé peu avant la prise de sang pour présenter un titre aussi élevé, d'autant plus que 8 mois plus tard son sérum révélait un titre de 1/20.

GARIN (37) et CAPPONI (15), qui ont étudié la toxoplasmose expérimentale du cobaye et du lapin avec la technique d'immunofluorescence indirecte, ont observé moins de un mois après le début de l'infection des titres dépassant le 1/1000.

L'existence d'un titre élevé chez un animal sain n'a rien de surprenant quand on sait que la toxoplasmose est une infection souvent inapparente.

Quelle que soit la méthode utilisée et le titre obtenu, l'interprétation des résultats doit se faire avec beaucoup de prudence, en tenant toujours compte des données cliniques

et de la persistance des anticorps longtemps après le début de l'infection.

Devant les difficultés soulevées par la réalisation du test de lyse des toxoplasmes ou épreuve de coloration, nous n'avons pas pu disposer d'une réaction de référence pour apprécier avec précision la qualité de la suspension de toxoplasmes que nous avons utilisée pour l'immunofluorescence indirectes.

BETZ (4) (5), qui a travaillé avec un antigène identique, estime, après avoir titré la sensibilité de son antigène vis à vis de sérums humains déjà éprouvés par l'épreuve de coloration, que les cultures cellulaires sont en mesure de fournir de bons antigènes pour l'immunofluorescence indirecte. Cet avis est partagé par WATTRE (97) qui a utilisé avec succès des toxoplasmes cultivés sur cellules HeLa.

La réaction de fixation du complément nous a donné un pourcentage de réactions positives presque identique à celui obtenu par BALOZET en 1955 (1), mais les titres que nous avons observés sont moins élevés.

Notre antigène, bien que spécifique, semble être légèrement moins sensible que ceux produits avec des membranes chorioallantoïdiennes ou préparés à partir de liquide allantoïdien ou d'exsudat péritonéal de cobayes (1) (64). Il possède cependant l'avantage d'être préparé à partir d'un matériel stable et homogène, facile à se procurer et à contrôler.

La corrélation que nous avons trouvée entre les titres obtenus par la fixation du complément et l'I.F. n'est pas surprenante. Elle a déjà été relevée chez l'homme par GARIN et AMBROISE THOMAS (36), WATTRE et COLL (97) et BETZ (4).

La réaction de fixation du complément apparaît comme une réaction spécifique mais peu sensible. Si elle peut convenir dans le diagnostic de la toxoplasmose spontanée, elle est insuffisante dans les enquêtes épidémiologiques (93) (94).

L'analyse du tableau VI nous permet de constater que la technique d'électrosynérèse s'est révélée la moins sensible.

Contrairement à ce qu'aurait pu laisser prévoir le travail de STRANNEGARD (90) qui a titré des sérums de sujets suspects de toxoplasmose aiguë à la fois par l'épreuve de coloration , la fixation du complément et par immunodiffusion, il n'existe qu'une corrélation très faible entre la fixation du complément et l'électrosynérèse.

Par contre, la concordance relevée entre la technique d'immunofluorescence indirecte et l'électrosynérèse est semblable à celle relevée par STRANNEGARD (90) entre l'épreuve de coloration et l'immunodiffusion pratiquée avec la méthode d'Ouchterlony; ce qui n'est pas surprenant quand on sait que

la plupart des auteurs attribuent la même valeur au dye-test et à l'immunofluorescence indirecte.

Pour expliquer ces données nous avons émis l'hypothèse que les anticorps précipitants décelés par la technique d'électrosynérèse apparaîtraient et disparaîtraient plus précocement que les anticorps fixant le complément.

Nous avons essayé de vérifier cette opinion en inoculant 8 chiens provenant de la fourrière d'Alger avec 15 x 10^6 toxoplasmes par voie sous-cutanée, sous un volume de 1 ml par chien. L'étude des anticorps précipitants pratiquée toutes les semaines est résumée dans le tableau VIII.

De l'étude de ce tableau, il ressort que les anticorps précipitants apparaissent dans les quinze jours qui suivent l'infection. Ils disparaissent par la suite très rapidement et ne persistent pas au-delà de la quatrième semaine.

Etude de la cinétique des anticorps précipitants lors de la toxoplasmose expérimentale du chien.

Tableau VIII

Numéro du chien	Saignée avant l'infect.	Saignée du 7è Jour	Saignée du 14è Jour	Saignée du 21è Jour	Saignée du 28è Jour
353	-	-	-	-	-
355	-	-	-	-	-
356	-	-	+	*	
357	-	-	+	-	-
359	-	-	-	-	-
360	-	-	-	-	-
361	-	-	+	-	-
362	-	+	+	+	-

* chien mort 3 semaines après le début de l'infection.

Il faut noter que tous les chiens inoculés n'ont pas produit des anticorps.

Par rapport aux anticorps précipitants mis en évidence

par la méthode de double diffusion d'Ouchterlony lors de la toxoplasmose expérimentale du lapin , il semble que les anticorps précipitants décelés par l'électrophorèse ont une cinétique très différente.

Chez le lapin le nombre maximum de lignes est observé 12 semaines après le jour de l'inoculation, mais plus d'un an et demi après le début de l'infection on observe encore des arcs de précipitation. (90)

Compte tenu de l'hétérogénéité du lot des chiens d'expérience, nous pensons que les résultats enregistrés au cours de ce travail doivent être interprétés en considérant à la fois que certains animaux avaient été probablement en contact avec des toxoplasmes et que la stimulation antigénique a pu être insuffisante.

Bien que cette expérience ne soit pas très concluante, nous pensons qu'il faudrait reprendre ces travaux pour mieux connaître les possibilités de cette technique, qui est d'une exécution facile et rapide et qui ne réclame pour être mise en oeuvre qu'un appareillage relativement peu coûteux.

S'il se confirmait que cette méthode peut détecter très précocement des anticorps antitoxoplasmiques, nous disposerions alors d'une méthode efficace pour situer avec précision le début de l'infection et susceptible de compléter les indications fournies par les autres réactions sérologiques.

CONCLUSION

Au cours de ce travail nous nous sommes attachés à répertorier et à expérimenter quelques-unes des méthodes qui ont été récemment préconisées pour le sérodiagnostic de la toxoplasmose.

Nous avons pu essayer avec succès des antigènes produits sur cellules Hela, en immunofluorescence indirecte, en fixation du complément et en électrosynérèse.

L'analyse immunoélectrophorétique a montré que ces antigènes contenaient 10 fractions, dont 5 étaient vraisemblablement spécifiques. Avec l'électrophorèse nous avons dénombré 5 fractions.

Les résultats enregistrés nous ont permis de constater que la toxoplasmose était une infection très répandue dans l'Algérois et que la technique d'immunofluorescence indirecte était la mieux adaptée aux enquêtes sérologiques, car la plus sensible.

La technique d'électrosynérèse s'est révélée beaucoup moins sensible que la réaction de fixation du complément, mais au cours de la toxoplasmose expérimentale du chien nous avons pu observer qu'elle était capable de déceler précocement sur 50p. 100 des animaux inoculés des anticorps antitoxoplasmiques.

Nous savons parfaitement qu'en raison du nombre restreint des données recueillies et des insuffisances de cette étude, nous ne pouvons pas prétendre tirer des conclusions définitives sur les techniques que nous avons expérimentées.

Nous espérons que ce travail, en apportant de nouvelles informations, suscitera d'autres études plus complètes et plus approfondies.

-:-:-:-

Vu :

Le Directeur de l'Ecole Vétérinaire

rapporteur

R. FLORIO

Vu :

Le Président de la Thèse

M. ARMENGAUD

Vu et Permis d'imprimer
Toulouse, le 14/10/71
Le Président de l'Université
Paul Sabatier

L. LARENG

BIBLIOGRAPHIE

1. BALOZET, (L.).- Enquête sérologique sur la toxoplasmose de l'homme et du chien dans la région d'Alger. Arch. Inst. Pasteur. Algérie., 1955, 33, 78-83.

2. BEN RACHID, (M.S.).- Sur la technique du sérodiagnostic de la toxoplasmose par hémagglutination passive. Ann. Parasitol. Hum. et Comp., 1965, 40, 393-401.

3. BEN RACHID, (M.S.) et BLAHA, (R.).- La toxoplasmose humaine et animale en Tunisie. La Tunisie Médicale., 1970, 48,101-110.

4. BETZ, (A.).- Diagnostic sérologique de la toxoplasmose au moyen d'antigènes préparés sur cultures cellulaires. Bull. Organis. Mond. Santé., 1968, 39, 367-374.

5. BETZ, (A.).- Sérodiagnostic de la toxoplasmose. Cours sur les techniques d'immunofluorescence. Travaux pratiques.O.M.S. Institut Pasteur, Paris. 1967, 63-65.

6. BICKFORD, (A.A.) and BURNSTEIN, (T.).- Maintenance of Toxoplasma gondii in monolayer culture of human. epithelial. (H.Ep.-2) cells. Am. J. Vet. Res., 1966, 27, 319-325.

7. BIER, (M.).- Electrophoresis (Theory, methods and applications) - Academic Press, New York and London, 1967, P 116.

8. BLATT, (W.F.), FEINBERG, (M.P.), HOPFENBERG, (H.P.) and SARAVIS, (C.A.).- Protein solutions concentration by a rapid method. Science., 1965, 150, 224-226.

9. BOCH, (J.) and ROMMEL, (M.).- Serological examination of Berlin dogs for toxoplasmosis. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 1963, 76, 292-296. (in the Veterinary Bulletin., 1963, 34, p 18.)

10. BORGEN, (P.H.F.) and BERG, (O.A.).- 1957. Toxoplasma dye test in dogs in Norway. Acta. Pathol. Microbiol. Scand. , 1957, 41, 353-357.

11. BURI, (H.) PIEKARSKI, (G.) and SCUPIN, (E.).- Excretion of Toxoplasma gondii by apparently healthy dogs. Kleintier Praxis., 1964, 9, 157-169. (in the Veterinary Bulletin., 1965, 35, p 210.

12. BUSSARD, (A.), et HUET, (J.).- Description d'une technique combinant simultanément l'électrophorèse et la précipitation immunologique dans un gel : l'électrosynérèse. Biochim. Biophys. Acta., 1959, 34, 258.

13. CAMARGO, (M.E.).- Comparative evaluation of toxoplasmosis indirect fluorescent and Sabin - Felman dye tests in a thousand human sera. A few unexpected results. Rev. Inst. med. trop. (Sao Paulo)., 1966, 8, 62-68.

14. CAMPBELL, (R.S.F.), MARTIN, (W.B.) and GORDON, (E.D.).- Toxoplasmosis as a complication of canine distemper. Vet. Rec., 1955, 67, 708-712.

15. CAPPONI, (M.).- Constatations personnelles pour le diagnostic sérologique de la toxoplasmose par l'immunofluorescence indirecte. Bull. Soc. Pathol. Exot., 1966, 59, 77-83.

16. CASTELLANI PASTORIS, (M.).- Zecche del genere ornithodorus portatrici di Toxoplasma gondii.- Parassitologia., 1969, 11, 73-75.

17. CHERNIN, (E.) and WELLER, (T.H.).- Further observations on the growth of Toxoplasma gondii in roller tube cultures of mouse and primate tissues. J. Parasitol., 1957,43, 33-39.

18. CHORDI, (A.), WALLS, (K.W.) and KAGAN, (I.G.).- Studies on the specificity of the indirect hemagglutination test for toxoplasmosis. J. Immunol. 1964, 93, 1024-1033.

19. CHORDI, (A.), WALLS, (K.W.) and KAGAN, (I.G.).- Analysis of Toxoplasma gondii antigens by agar diffusion methods.- J. Immunol, 1964, 93, 1034-1044.

20. COGNET, (J.) et GARRIGUE, (G.).- Conservation de Toxoplasma gondii sur cultures cellulaires à basse température. Soc. Med. Milit. France., 1968, 62, 392-395.

21. COOK, (M.K.) and JACOBS, (L.).- Cultivation of Toxoplasma gondii in tissue cultures of various derivations. J. Parasitol, 1958, 44, 172-182.

22. Cours d'Immunologie générale et de Sérologie de l'Institut Pasteur de Paris., Travaux pratiques., 1968, p. 71-75.

23. CULLIFORD, (B.J.).- Precipitin reactions in forensic problems. Nature., 1964, 201, 1092-1094.

24. DENIS, (C.).- Emploi de particules d'acryl dans le sérodiagnostic de la toxoplasmose. Pathol. et Microbiol. (Bâle)., 1967, 40, 481-488.

25. EAGLE, (H.).- Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. Science, 1959, 130, 432-437.

26. ENGELBRECHT, (E.).- Nouvelle réaction pour le diagnostic de la toxoplasmose. La floculation sur lame. Pathol. et Microbiol. (Bâle)., 1965, 28, 907-916.

27. EYLES, (D.E.), COLEMAN, (N.), and CAVANAUGH, (D.J.).- Préservation of Toxoplasma gondii by freezing. J. Parasitol., 1956, 42, 408-413.

28. EYLES, (D.E.), GIBSON, (C.L.), COLEMAN, (N.), SMITH, (C.S.), JUMPER, (J.R.), and JONES, (F.E.).- The prevalence of toxoplasmosis in wild and domesticated animals of the Memphis region. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1959, 8, 505-510.

29. FAURE, (D.).- La toxoplasmose humaine, Epidémiologie, Enquête sérologique. These. Doct. Med. Lyon., 1953.

30. FELDMAN, (H.A.).- The relationship of toxoplasma antibody activator to the serum properdin system. Ann. N.Y.-Acad. Sci., 1956, 66, 263-267.

31. FELDMAN, (H.A.), and MILLER, (L.T.).- Serological study of toxoplasmosis prevalence. Am. J. Hyg., 1956, 64, 320-335.

32. FELTCHER, (S.).- Indirect fluorescent antibody technics in the serology of Toxoplasma gondii. J. Clin. Pathol., 1965, 18, 193-199.

33.FRANCKHAUSER, (R.).- C.R. Congrès international de pathologie comparée. Madrid, mai 1952, 471-475.

34. FRENKEL, (J.K.).- Dermal hypersensitivity to toxoplasma antigens (toxoplasmin). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1948, 68, 634-639.

35. FULTON, (J.D.), and TURK, (J.L.).- Direct agglutination test for Toxoplasma gondii. Lancet., 1959, 2, 1068-1069.

36. GARIN (J.P.) et AMBROISE-THOMAS, (P.).- Le diagnostic sérologique de la toxoplasmose par la méthode des anticorps fluorescents (technique indirecte). Presse Méd., 1963, 52, 2485-2488.

37. GARIN, (J.P.), AMBROISE-THOMAS, (P.), CORNET, (A.), KIEN-TRUONG, (T.) et DESPEIGNES, (J.) .- Intérêt de la fluorescence et de l'immunofluorescence dans le diagnostic parasitologique et sérologique de la toxoplasmose. Rev. Inst. Pasteur. Lyon., 1968, 1, 179-203.

38. GIBSON, (C.L.) et EYLES, (D.E.).- Toxoplasma infections in animals associated with case of human congenital toxoplasmosis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1957, 6, 990-1000.

39. GIROUD, (M.P.).- La toxoplasmose. Cours de microbiologie 1967-1968 de l'Institut Pasteur de Paris.

40. GIROUD, (P.), LE GAC, (P.), GAILLARD, (J.A.) et ROGER (F.) - La toxoplasmose, maladie de l'adulte existe soit comme une affection fébrile soit comme une affection exanthématique de type boutonneux. L'inoculation des toxoplasmes le prouve. Bull. Soc. Pathol. Exot.,1953, 46, 318-323.

41. GOLDMAN, (M.).- Staining Toxoplasma gondii with fluorescent labelled antibody. II. A new serological test for antibodies to toxoplasma based upon inhibition of specific staining. J. Exp. Med., 1957, 105, 549-556.

42. GROULADE, (P.).- Un cas de toxoplasmose miliaire diffuse chez le chien. Bull. Acad. Vet. Fr., 1956, 29, 49-57.

43. GROULADE, (P.).- Toxoplasmose du chien et du chat. Rev. Path. Gen., 1963, 752, 959-999.

44. HURISSE, (G.) et PEYRAUD, (B.).- Enquête avec le test d'hémagglutination "Eiken" sur l'infection toxoplasmique des porcs abattus en France. Revue Med. Vet., 1969, 120, 1023-1041.

45. ISHU, (T.) et all. Toxoplasma antibody survey using the dye test on cats and dogs in the Yokohama area; relationship between results and clinical infection. J. Japan. Vet. Med. Ass., 1966, 19, 3-7 et 9 (in the Veterinary Bulletin, 1966, 36, p. 484.)

46 JACOBS, (L.) and LUNDE, (M.N.).- A hemagglutination test for toxoplasmosis. J. Parasitol. 1957, 43, 308-314.

47. JACOBS, (L.), MELTON, (M.L.) and COOK, (M.K.).- Observations on toxoplasmosis in dogs. J. Parasitol., 1955, 41, 353-360.

48. JENNIS, (F.).- A simplified hemagglutination test for toxoplasmosis using pyruvic aldelyde treated cells. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1966, 44, 317-322.

49. KELEN, (A.E.), AYLON-LENDL, (J.) and LABZOFFSKY, (N.A.) .- Indirect fluorescent antibody method in serodiagnostic of toxoplasmosis. Can. J. Microbiol. (Ottawa)., 1962, 8, 545-554.

50. KOESTNER, (A.) and COLE, (C.R.).- Neuropathology of canine toxoplasmosis Am. J. Vet. Res., 1960, 21, 831-844.

51. KRAMAR, (J.).- The fluorescent staining complement for the serodiagnostic of toxoplasmosis. Folia Parasitol. (Prague)., 1967, 14, 5-12.

52. KUIL, (H.).- The prevalence of antibodies against toxoplasma in stray dogs in Paramaribo, Surinam. Dutch Guiana. Ann. Trop. Med. Parasitol., 1966, 60, 22-24.

53. LAINSON, (R.).- Toxoplasma infection in dogs. The incidence of complement fixing antibodies among dogs in London. Ann. Trop. Med. Parasitol., 1956, 50, 172-186.

54. LELONG, (M.) et DESMONTS, (G.).- L'emploi du microscope à contraste de phase dans la réaction de Sabin-Feldman. C.R. Soc. Biol. 1951, 145, 1660-1661.

55. LEPINE, (P.).- Techniques de laboratoire en virologie humaine. Masson Paris, 1964, p. 196.

56. LEVADITI, (C.), SANCHIS-BAYARRI, (V.), LEPINE, (P.), et SCHOEN, (R.).- Etude sur l'encéphalomyélite provoquée par le Toxoplasma cuniculi. Ann. Inst. Pasteur. Paris., 1929, 43, 1063-1080.

57. LE VIGUELLOUX, (J.) et EPARDEAU, (B.).- Utilisation des réactions d'immunofluorescence indirecte dans les études épidémiologiques. A.- Etude Préliminaire - La toxoplasmose. Med. Trop. Fr., 1969, 29, 76-83.

58. LUNDE, (M.N.) and JACOBS, (L.).- Evaluation of a latex agglutination test for toxoplasmosis. J. Parasitol.,1967, 53, 933-936.

59. LUNDE, (M.N.), JACOBS, (L.), and WOOD, (R.M.).- Comparaison of dye and hemagglutination test on sera of suspected cases of toxoplasmic uveitis. Arch. Ophtalmol. (Chicago). 1963, 69, 10-12.

60. LUND, (E.), LYCKE, (E.) and SOURANDER, (P.).- Some aspects on cultivation of Toxoplasma gondii in cell cultures. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 1963, 57, 199-210.

61. MAC CULLOCH, (W.F.), FOSTER, (B.G.) and BRAUN, (J.L.).- Sérological survey of toxoplasmosis in Iowa domestics animals. J. Amer. Vet. Med. Ass., 1964, 144, 272-275.

62. MELLO, (U.).- Un cas de toxoplasmose du chien observé à Turin. Bull. Soc. Pathol. Exot.,1910, 3, 359-363.

63. MILLER, (L.T.), and FELDMAN, (H.A.).- Incidence of antibodies for toxoplasma among various species. J. Infect.Dis., 1953, 92, 118-120.

64. MORRIS, (J.A.), AULISIO, (C.G.), and Mc COWN, (J.M.).- Serological evidence of toxoplasmosis in animals. J.Infect. Dis., 1956, 98, 52-54.

65. NICOLAU, (S.) et RAVELO, (A.).- La réaction de fixation du complément dans le sérum et les extraits d'organes d'animaux atteints de toxoplasmose expérimentale. Bull. Soc. Pathol. Exot., 1937, 30, 855-860.

66. NICOLLE, (CH.) et MANCEAUX, (L.).- Sur un protozoaire nouveau du Gondii. Arch. Inst. Pasteur. Tunis., 1909, 4, 97-103.

67. O'CONNOR, (G.R.).- Antitoxoplasma precipitins in aqueous humour. New application of the agar diffusion technics. Arch. Ophthalmol. (Chicago)., 1957, 57, 52-57.

68. O.M.S. - La toxoplasmose. Série de rapports techniques. Rapport d'une réunion OMS de chercheurs., 1969, N° 431.

69. OTTEN, (E.).- Statistische Unterlagen zur Toxoplasmose - Komplement Bindungsreaktion. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr., 1952, 59, 166-168.

70. OTTEN, (E.), WESTPHAL, (A.) et KAJAHN.- Ueber das Vorkommen von Toxoplasmose beim Hunde, statitische Erhebungen. Monatschr.Prakt. Tierheilh., 1950, 2, 305-308.

71. PAUTRIZEL, (R.), RIPERT, (C.) et TRIBOULEY-DURET.(J.).- Les tests séroimmunologiques de la toxoplasmose. Mécanismes de la réaction de Sabin Feldman. Pathol. Biol., 1965, 13, 589-594.

72. PIERREUX, (G.).- Culture de Toxoplasma gondii sur tissus, Ann. Soc. Belg. Med. Trop., 1963, 43, 241-246.

73. ROEVER-BONNET, (H.de).- Toxoplasma infecties by huidieren en slachtvee. Tydschr. Diergeneesk. (Utrecht)., 1958, 83, 1073-1077.

74. RONDANELLI, (E.G.), CAROSI, (G.), GERNA, (G.) et FRANCHI, (P.).- Aspetti ultra-strutturali della reproduzione di Toxoplasma gondii in pseudocisti . Boll. Ist. Sieroter. Milan 1968, 47, 530-546.

75. ROUSSEL, (J.L.).- Agglutination de particules sensibilisées dans le serodiagnostic de la toxoplasmose. Etude des particules de bentonit et de kaolin. Thèse. Doct. Med. Lyon., 1964.

76. SABIN, (A.B.) and FELDMAN, (H.A.).- Dyes as microchemical indicators of new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (Toxoplasma). Science., 1948, 108, 660-663.

77. SABIN, (A.B.) and RUCHMAN, (I.).- Charactéristics of the toxoplasma neutralizing antibody. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1942, 51, 1-6.

78. SATO, (N.).- Studies on the distribution of dye test antibodies among animals in Hokkaido and on the complement fixing antigen for toxoplasmosis. Jap. J. Vet. Res., 1960, 8, 217-218.

79. SCHEIDEGGER, (J.J.).- Une microméthode de l'immuno-électrophorèse . Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol., 1955, 7, 103-110.

80. SCHUHOVA, (V.).- Long term culture of Toxoplasma gondii on HeLa. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. (Prague)., 1960, 4, 131-132.

81. SHEFFIELD, (H.G.), and MELTON, (M.L.).- The fine structure and reproduction of Toxoplasma gondii. J. Parasitol., 1968, 54, 209-226.

82. SIIM, (J.C.) , BIERING-SORENSEN, (U.) et MOLLER, (T.).- Toxoplasmosis in domestic animals. Adv. Vet Sc., 1963, 8, 335-429.

83. SIIM, (J.) and LIND, (K.).- A toxoplasma floculation test. Acta. Pathol. Microbiol. Scand., 1960, 50, 445-446.

84. SIMITCH, (TSCH.), BORDJOCHKS, (Z.L.), BORDJOCHKI, (A.) et POPCENITCH, (S.).- L'infection expérimentale du chien avec Toxoplasma gondii par voie buccale. Arch. Inst. Pasteur Algérie., 1957, 35, 368-371.

85. SOHIER, (R.), Diagnostic des maladies à virus, Flammarion, Paris p. 110.

86. SOURANDER, (P.), LYCKE, (E.) et LUND , (E.).- Observations on living cells infested with Toxoplasma gondii. Br. J. Exp. Pathol., 1960, 41, 176-178.

87. STADTBAEDER, (S.) TELLIER-VERHEYDEN, (N.) et WEBER,(M.)- Diagnostic sérologique de la toxoplasmose par immunofluorescence. Acta Clin. belg., 1964, 19, 161-166.

88. STEEN, (E.) et KASS, (E.).- A new toxoplasma antigen for complement fixation test. Acta. Pathol. Microbiol. Scand., 1951, 28, 36-39.

89. STRANNEGARD, (O) .- Studies of toxoplasma precipitinogens and their corresponding antibodies by means of diffusion in gel methods. Br. J. Exp. Pathol., 1962, 43, 600-613.

90. UCHINUNO, (Y.), TATEYAMA, (Y.), ICHIHAVA, (T.) and KITAHARA, (Y.).- A serological survey of toxoplasmosis in dogs using the hoemagglutination test and isolation of the organism. J. Japan. Vet. Med. Ass., 1967, 20, 477-480..

91. VALLEE, (A.), GROULADE, (R.), LEVADITI, J.C.) DESMONTS (G.) et VIRAT, (J.).- Contribution à l'étude de la toxoplasmose expérimentale du chien. Bull. Acad. Vet. Fr., 1961, 34, 43-56.

92. VERGNOUX, (F.).- Considérations sur l'épidémiologie de la toxoplasmose. Thèse. Doct. Vet. Toulouse. 1970.

93. VIRAT, (J.).- Le diagnostic sérologique de la toxoplasmose, résultats obtenus avec un antigène fixant le complément préparé sur cultures cellulaires. Pathol. Biol., 1967, 15, 60-64.

94. WARREN, (J.) and RUSS, (S.B.).- Cultivation of toxoplasma in embryonated egg. An antigen derived from chorioallantoic membrane. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1948, 67, 85-89.

95. WARREN, (J.) and SABIN, (A.B.).- The complement fixation reaction in toxoplasmosis infection. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1942, 51, 11-14.

96. WATTRE, (P.), BRULE, (R.), CAPRON, (A.) , SAMAILLE, (J.) et FRUIT. (J.).- Analyse antigénique de Toxoplasma gondii et diagnostic immunologique de la toxoplasmose humaine. Ann. Inst. Pasteur. Lille., 1969, 20, 167-182.

97. WERY, (M.).- Indication de l'immunofluorescence dans la toxoplasmose clinique et expérimentale. Ann. Soc. Belge Med. Trop., 1965, 45, 541-546.

98. WESTPHAL, (A.).- Eine neue Toxoplasmose komplement - Bindungsreaktion. Ztschr. f. Tropenmed. u. Parasit., 1951, 3, 191-204.

99. WESTPHAL, (A.), BAUER, (F.).- Weitere Untersuchungen und Betrachtungen zur Toxoplasmosekomplement-Bindungsreaktion. Westphal. Ztschr. f. Tropenmed. u. Parasit., 1952, 3, 326-338.

100. WORK, (K.).- The incidence of toxoplasma antibodies among dogs and cats in Denmark. Acta. Pathol. Microbiol. Scand., 1969, 75, 447-456.

101. YANOVSKY, (J.F.), TRAVERSA, (O.C.), SCHMUNIS, (G.A.) CANTARELLA, (A.), PANDIELLA, (A.A.) et POTHIER, (M.A.).- Nouvel antigène pour la réaction de fixation du complément pour le diagnostic de la toxoplasmose. Ann. Parasitol. Hum. et Comp., 1968, 43, 539-544.

102. ZAMAN, (C.L.).- Precipitins against tubercle bacillus antigens. III. Demonstration of precipitins against tubercle baccillus antigens by means of electrosyneresis general remarks. Selected Papers (The Royal Netherlands Tuberculosis Association)., 1968, 11 , 51-69.

103. ZARDI, (O.).- Gli anticorpi fluorescenti nella diagnostica per la toxoplasmosi. Nuovi. Ann. Ig. Microbiol. Ital., 1963, 14, 585.612.

-:-:-:-

IMPRIMERIE MECANOGRAPHIQUE ISSY-COPIE
Dépôt Légal n° 1009 - 2ème trimestre 1972

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I : Toxoplasmes et Toxoplasmose 11

1) le toxoplasme 11
2) la toxoplasmose canine 13
3) l'épidémiologie de la toxoplasmose 15

CHAPITRE II : Diagnostic sérologique de la Toxoplamose 17

1) les méthodes sérologiques de diagnostic 17
   a) test de neutralisation
   b) épreuve de coloration ou test de lyse des toxoplasmes
   c) fixation du complément
   d) immunofluorescence indirecte
   e) hémagglutination indirecte
   f) agglutination et floculation
   g) réaction de précipitation en milieu gélifié
2) valeur des méthodes proposées 22

TRAVAUX PERSONNELS 25

CHAPITRE I : La culture de Toxoplasma gondii in vitro 26

Utilisation de cette technique à la préparation d'antigènes pour le diagnostic sérologique de la toxoplasmose

1) la culture de Toxoplasma gondii in vitro 27
   a) la souche de toxoplasmose
   b) le système cellulaire

c) l'infection des cellules

2) les méthodes de préparation des antigènes 29

a) préparation d'un antigène soluble pour la fixation du complément et l'électrosynérèse

b) préparation d'une suspension de toxoplasmes pour l'immunofluorescence indirecte

CHAPITRE II : L'analyse immunoélectrophorétique et électrophorétique d'un antigène obtenu sur cultures cellulaires 31

1) Immunoélectrophorèse 31

a) technique

b) résultats et discussion

2) Electrophorèse 36

a) technique

b) résultats et discussion

3) Conclusion 40

CHAPITRE III : L'enquête épidémiologique 41

1) Matériel et méthodes 41

a) immunofluorescence indirecte

b) fixation du complément

c) électrosynérèse

2))Résultats 51

3) Discussion 57

CONCLUSION 60

BIBLIOGRAPHIE 63